

Gfi-1 und Pias3 als Antagonisten bei der Stat3 Signaltransduktion

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Bernd Rödel

aus Köln

9. Dezember 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

3. Gutachter: Prof. Dr. G. Henkel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Henkel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.2000

***„To boldly go
where no man has gone before...”***

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Die Zelle als Ort der Signalintegration im Organismus	1
1.2 Signaltransduktionsmechanismen: Regulation der Zellphysiologie durch transkriptionelle und nicht-transkriptionelle Effekte	2
1.3 Tumorgenese als Folge fehlregulierter Signalverarbeitung	11
1.4 Das Immunsystem als Modell einer komplexen Regulation	13
1.5 Gfi-1 als neu entdecktes Proto-Onkogen in murinen T-Zelltumoren	21
1.6 Fragestellung: Funktion von Gfi-1 innerhalb bekannter Signaltransduktionswege ?	23

2. Ergebnisse

2.1 Mutanten des Zinkfingerproteins Gfi-1	25
2.2 Suche nach Gfi-Interaktionspartnern	25
2.3 Identifizierung von „Barry“ als Teil der volllängen cDNA von Pias3	28
2.4 Strukturelle Analyse von Pias3 und möglicher homologer Proteine	29
2.5 RNA-Expressionsanalyse von Pias3	32
2.6 Kopräzipitation von Gfi-1 und Pias3 <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	34
2.7 Intrazelluläre Lokalisation von PIAS Proteinen, Gfi-1B, Gfi-1 und seinen Mutanten	37

2.7.1	Gfi-1, Gfi-1B und Pias3 sind alle in nukleären Punkten im Zellkern lokalisiert	37
2.7.2	Die Gfi Mutanten Gfi-II und Gfi-III haben eine andere intrazelluläre Lokalisation als Gfi-1	38
2.8	Kolokalisation von Gfi-1 und Pias3	40
2.8.1	Gfi-1 GFP und Flag Pias3 sind in den „nuclear dots“ kolokalisiert	40
2.8.2	Gfi-II GFP aber nicht Gfi-III GFP be- einflussen die Kernlokalisierung von Flag Pias3	40
2.9	Gfi-I GFP und Pias3 GFP wirken auf die intra- zelluläre Verteilung von aktiviertem Stat3	44
2.9.1	Pias3 GFP und aktiviertes Stat3 sind unmittelbar nach der Aktivierung im Zellkern kolokalisiert	45
2.9.2	Gfi-I GFP verändert möglicherweise die intra- nukleäre Verteilung von aktiviertem Stat3 Protein	48
2.10	Gfi-1 verstärkt die Transkription Stat3 abhängiger Promotoren in Reportergen Assays ohne selbst DNA zu binden	50
2.10.1	Der -Antichymotrypsinpromotor als Ziel einer Stat3 Transaktivierung	50
2.10.2	Pias3 reprimiert die Stat3 Aktivierung des -Antichymotrypsinpromotors	51
2.10.3	Gfi-1 und Gfi-II Kotransfektionen verstärken das Stat3 Signal nach Interleukin 6 Stimulation	52
2.10.4	Der Anteil von Gfi-1 außerhalb der Zinkfinger reicht für eine Aufhebung der Repression der Stat3 Signaltransduktion durch Pias3 aus	54
2.11	Gfi-1 verstärkt auch den Effekt von Interleukin 6 auf den c-fos Promotor	56
3.	Diskussion	
3.1	Pias3 als Interaktionspartner von Gfi-1 und Verbindung zum Stat3 Signaltransduktionsweg	58

3.1.1 Die Interaktion <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	58
3.1.2 Modell zum Einfluß von Gfi-1 und Pias3 auf die Stat3 Signaltransduktion	62
3.1.2.1 Das Modell einer direkten Interaktion von Pias3 und Gfi-1	63
3.1.2.2 Das Modell einer indirekten Interaktion von Pias3 und Gfi-1	63
3.1.3 Die Bedeutung der Gfi-1-Pias3 Interaktion für die Gfi-1 Funktion	64
3.1.4 Funktionen von Pias3 außerhalb des Stat3 Signalweges	65
3.2 Der Stat3 Signalweg und die beschriebenen Wirkung von Gfi-1 auf die Zellphysiologie	65
3.2.1 Indirekter Effekt von Stat3 auf die Interleukin 2 Signaltransduktion	66
3.2.2 Einfluß von Gfi-1 auf die Zellzyklusprogression über verstärkte Stat3 Aktivierung	68
3.2.3 Gfi-1 und Stat3 als Onkogene	70
 4. Zusammenfassung	 72
 5. Material und Methoden	
5.1 Lösungen	73
5.2 Medien	76
5.3 Bakterienstämme	80
5.4 Hefestämme	80
5.5 Zelllinien	80
5.6 Arbeiten mit DNA und RNA	
5.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Mini-Präp)	81
5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen (Maxi-Präp)	81
5.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA für Transfektionen	82

5.6.4	Isolierung von RNA	82
5.6.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung	82
5.6.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	82
5.6.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	83
5.6.8	Restriktionsverdau von DNA	83
5.6.9	Auffüllen überhängender 3'-Enden	83
5.6.10	Auffüllen überhängender 5'-Enden	83
5.6.11	Dephosphorylieren von DNA-Fragmenten an den 5'-Enden	83
5.6.12	Ligation	84
5.6.13	Herstellung kompetenter Bakterien	84
5.6.14	Transformation von kompetenter Bakterien	84
5.6.15	Einfrieren und Auftauen von Bakterienzellen	84
5.6.16	Sequenzierung von DNA	85
5.6.17	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	85
5.6.18	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden	86
5.6.19	Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)	86
5.6.20	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	86
5.6.21	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)	86
5.6.22	Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nylonmembranen (Southern Blot & Northern Blot)	86
5.6.23	Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nitrozellulosemembranen	87
5.6.24	Polymerasekettenreaktion (PCR)	87
5.6.25	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	88
5.6.26	DNase I Verdau von RNA	88
5.6.27	Rapid Amplification of cDNA ends (RACE-PCR)	88
5.6.28	Absuchen einer cDNA Genbibliothek	88
5.7 Arbeiten mit Proteinen		
5.7.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	89

5.7.2 Gesamtproteinextraktion aus Bakterien	89
5.7.3 Gesamtproteinextraktion aus Hefen	89
5.7.4 Gesamtproteinextraktion aus Zellen	90
5.7.5 <i>In-vitro</i> Translation von Proteinen (TNT-System)	90
5.7.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung	91
5.7.7 Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Immunoblot)	91
5.7.8 Rekombinante Expression von Proteinen in Bakterien	92
5.7.9 Kopräzipitation von Proteinen <i>in-vitro</i>	93
5.7.10 Kopräzipitation von Proteinen <i>in-vivo</i>	93
5.8 Arbeiten mit Hefe	
5.8.1 Transformation von Hefezellen	94
5.8.2 Etablieren von Hefeklonen	95
5.8.4 Einfrieren und Auftauen von Hefezellen	95
5.8.5 Induktion und Repression von Hefepromotoren durch selektive Medien	95
5.8.6 -Galaktosidase-Assay	96
5.8.7 Absuchen einer Genbibliothek durch Selektion in Hefe („Two-Hybrid“ System)	97
5.9 Arbeiten mit Zellen	
5.9.1 Passagieren von Zellen	98
5.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	99
5.9.3 Transfektion von Zellen	99
5.9.4 Reportergen-Assay	99
5.9.5 Immunfluoreszenz	100
5.10 Verwendete Antikörper und Oligonukleotide	
5.10.1 Antikörper und ihre Hersteller	101
5.10.2 Oligonukleotide und ihre Sequenz	101
5.11 Verwendete Geräte und Computerprogramme	
5.11.1 Liste der verwendeten Spezialgeräte und ihre Hersteller	102
5.11.2 Liste der verwendeten Computerprogramme und ihre Hersteller	103
6. Literaturverzeichnis	104

7. Anhang

7.1 Lebenslauf	121
7.2 Akademische Lehrer	122
7.3 Danksagung	123
7.4 Ehrenwörtliche Erklärung	124

Abkürzungen:

Abb.	<u>A</u> bbildung
APS	<u>A</u> mmoniumperoxidisulfat
ATP	<u>A</u> denosintri <u>ph</u> ospat
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar
BSA	engl. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation (Nomenklatur für Zelloberflächenmarker)
cDNA	engl. <u>c</u> omplementary DNA
Ci	<u>C</u> urie
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
cpm	engl. <u>c</u> ounts per <u>m</u> inute
d	<u>d</u> ay
dATP	<u>D</u> esoxy <u>a</u> denosintri <u>ph</u> ospat
dCTP	<u>D</u> esoxycy <u>t</u> osintri <u>ph</u> ospat
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
dGTP	<u>D</u> esoxyguanosintri <u>ph</u> ospat
DMEM	„ <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle <u>m</u> edium“
DMSO	<u>D</u> imethylsulfo <u>x</u> id
DNA	engl. <u>D</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleotidtri <u>ph</u> ospat
DTT	<u>D</u> ithiotreitol
dTTP	<u>D</u> esoxythymidintri <u>ph</u> ospat
EDTA	engl. <u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> cetic acid
Fa	<u>F</u> irma
FCS	engl. <u>F</u> etal <u>c</u> alve <u>s</u> erum
FITC	<u>F</u> luoresceiniso <u>t</u> hiocyanat
h	engl. <u>h</u> our
IL	<u>I</u> nterleukin
kb	<u>K</u> ilobasen
kDa	<u>K</u> ilodalton
min	<u>m</u> inute
MOPS	<u>M</u> orpholinopropansulfonsäure
mRNA	engl. <u>m</u> essenger RNA

NC	<u>N</u> itro <u>c</u> ellulose
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PAA	<u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mid
PBS	engl. <u>P</u> hosphat buffered saline
RNA	engl. <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SDS	engl. <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
sec	engl. <u>s</u> ec <u>o</u> nd
SSC	engl. <u>S</u> odium <u>S</u> odium <u>c</u> itrate
STE	engl. <u>S</u> odium- <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA solution
t	engl. <u>t</u> ime
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA Puffer
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orate- <u>E</u> DTA Puffer
TCR	engl. <u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA Puffer
TEMED	N',N, N', N'- <u>T</u> etram <u>e</u> thylendi <u>a</u> min
TPA	13-O- <u>T</u> etradecanoylphorbol-13- <u>a</u> cetate
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>m</u> inute
V	<u>V</u> olt
v/v	<u>V</u> olumen/ <u>V</u> olumen
W	<u>W</u> att
w/v	<u>W</u> ichte/ <u>V</u> olumen

1. Einleitung

1.1 Die Zelle als Ort der Signalintegration im Organismus

Jedes Lebewesen sichert seine Existenz, indem es auf seine Umweltbedingungen angemessen reagiert. Bei einzelligen Organismen findet diese Reaktion naturgemäß auf der Ebene des betroffenen Einzellers statt (Dhanasekran, 1998). Die einzelnen Zellen von mehrzelligen Organismen müssen jedoch ihre Reaktion untereinander abstimmen, damit ein gemeinsames Überleben gesichert wird (Schwartz et al., 1999). Erst durch die Kooperation aller Zellen eines mehrzelligen Organismus erlangt dieser einen Selektionsvorteil in der Evolution. Die generellen Entscheidungen, die jede einzelne Zelle dabei zu treffen hat, reichen von Proliferation, über Differenzierungsschritte bis hin zum "Programmierten Zelltod" (Apoptose) (Abb.1). Daneben verfügen Zellen durch ihre Spezialisierung noch über besondere Eigenschaften wie z. B. die Fähigkeit zur Kontraktion, die Fähigkeit Reize weiterzuleiten, die Fähigkeit Substanzen herzustellen, zu speichern und freizusetzen, die ebenfalls einer externen Kontrolle unterliegen. Die Integration aller Umweltsignale findet nach heutigem Kenntnisstand überwiegend auf zellulärer Ebene statt (Brugge et al., 1999, Bhala et al., 1999). Für die Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere wurde der Begriff Signaltransduktion geprägt. Hierunter versteht man sowohl im biologischen wie auch im informationstechnischen Sinne die extrazelluläre Aufnahme unterschiedlicher Stimuli, die anschließende intrazelluläre Weitergabe und Verarbeitung, sowie die entsprechende Reaktion der gesamten Zelle (zur Übersicht: Schwartz et al., 1999). Während der Evolution haben sich zur Bewältigung dieser Aufgabe mehrere, zwischen unterschiedlichen Evolutionsstufen konservierte, biochemische Mechanismen entwickelt. (Dyson et al., 1999).

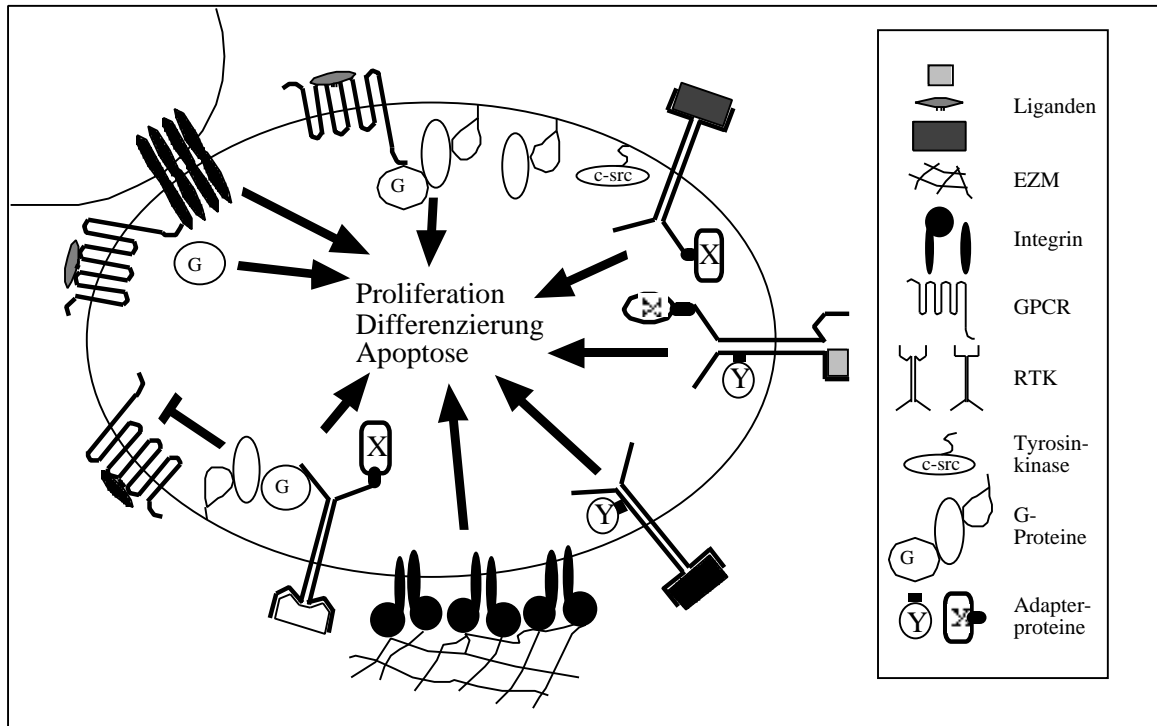


Abb. 1: Die Zelle im Zentrum verschiedener Signale

Abbildung modifiziert nach Schwartz et al., 1999. Das Bild zeigt eine Zelle unter Einfluß der Umgebungssignale und ihre möglichen Reaktionen. RTK = Rezeptortyrosinkinase, GPCR = engl. G-Protein coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor), EZM Extrazelluläre Matrix.

1.2 Signaltransduktionsmechanismen: Regulation der Zellphysiologie durch transkriptionelle und nicht-transkriptionelle Effekte

Die biochemischen Vorgänge bei der Signaltransduktion lassen sich nach mehreren Kriterien, wie z. B. Auftauchen in der Stammesentwicklung, Geschwindigkeit, Ort, Reaktions-mechanismus, in Gruppen unterteilen. Für die weitere Betrachtung ist es in diesem Fall sinnvoll, zunächst eine grobe Unterscheidung in Signaltransduktion ohne unmittelbare Auswirkung auf die Transkription und Signaltransduktion durch Veränderung der Transkription zu treffen. Die erste Gruppe spielt im Rahmen der weiteren Betrachtung keine große Rolle und soll nur kurz angesprochen werden. Die wesentlichen Beispiele für eine Signalweiterleitung ohne direkte Beeinflussung der Transkriptionsmaschinerie finden sich in der Nervenweiterleitung in höheren Eukaryonten, in der Freisetzung intrazellulär gespeicherter Substanzen (Degranulation) (Alberts et al., 1994), sowie bei der Änderung der Zellmorphologie (Salmon et al., 1999, siehe Abb. 2 a Mitte rechts „Zytoskelett“), bei bestimmten Formen der Apoptose (Li et al., 1999) und bei der Regulation der

Proteinexpression auf translationaler Ebene (Hentze, 1995, siehe Abb.2 a Mitte links Kasten um „*Proteinexpression*“).

Die Signale, die über eine Rezeptor-Liganden Interaktion zu einer Änderung der Transkription in der Zelle führen, beeinflussen vor allem die Proliferation, die Differenzierung und den Zelltod (Apoptose). Naturgemäß muß ein Signal, das auf die Transkriptionsmaschinerie wirkt, direkt oder indirekt in den Zellkern weitergeleitet werden (Übersicht in Abb. 2 a, Karin, 1994). Im Laufe der Evolution haben sich hierzu einige Signalwege entwickelt, die sich in ihren biochemischen Mechanismen unterscheiden. Durch eine Signalintegration können sich die Signalwege gegenseitig beeinflussen (Schwartz et al., 1999). In Abb. 2 a sind die einzelnen Reaktionswege schematisch dargestellt und ihr Zusammenspiel wird exemplarisch aufgeführt.

Sehr viele Reaktionswege gehen einher mit der Modifikation von intrazellulären Proteinen durch das Anhängen bzw. Entfernen von Phosphatresten an die Hydroxygruppe der Aminosäuren Tyrosin, Serin oder Threonin (Schenk, 1999). Eine einfachere Form der Signalweiterleitung findet sich bei den Steroidhormonen (in Abb. 2 a nicht gezeigt). Sie können durch Diffusion direkt in die Zelle gelangen, mit einem spezifischen intrazellulären Rezeptorprotein einen Komplex bilden und in dieser Form im Kern die Transkription ihrer Zielgene beeinflussen (Mangelsdorf et al., 1995). Eine Form des Signals, das nicht durch einen löslichen Liganden, sondern durch die Verbindung zur extrazellulären Matrix in die Zelle gelangt, wird durch Adhäsionsmoleküle, die in die Zellmembran eingebaut sind, ins Zellinnere weitergeleitet (Schoenwaelder et al., 1999, Hunter, 1997, Shyy et al., 1997).

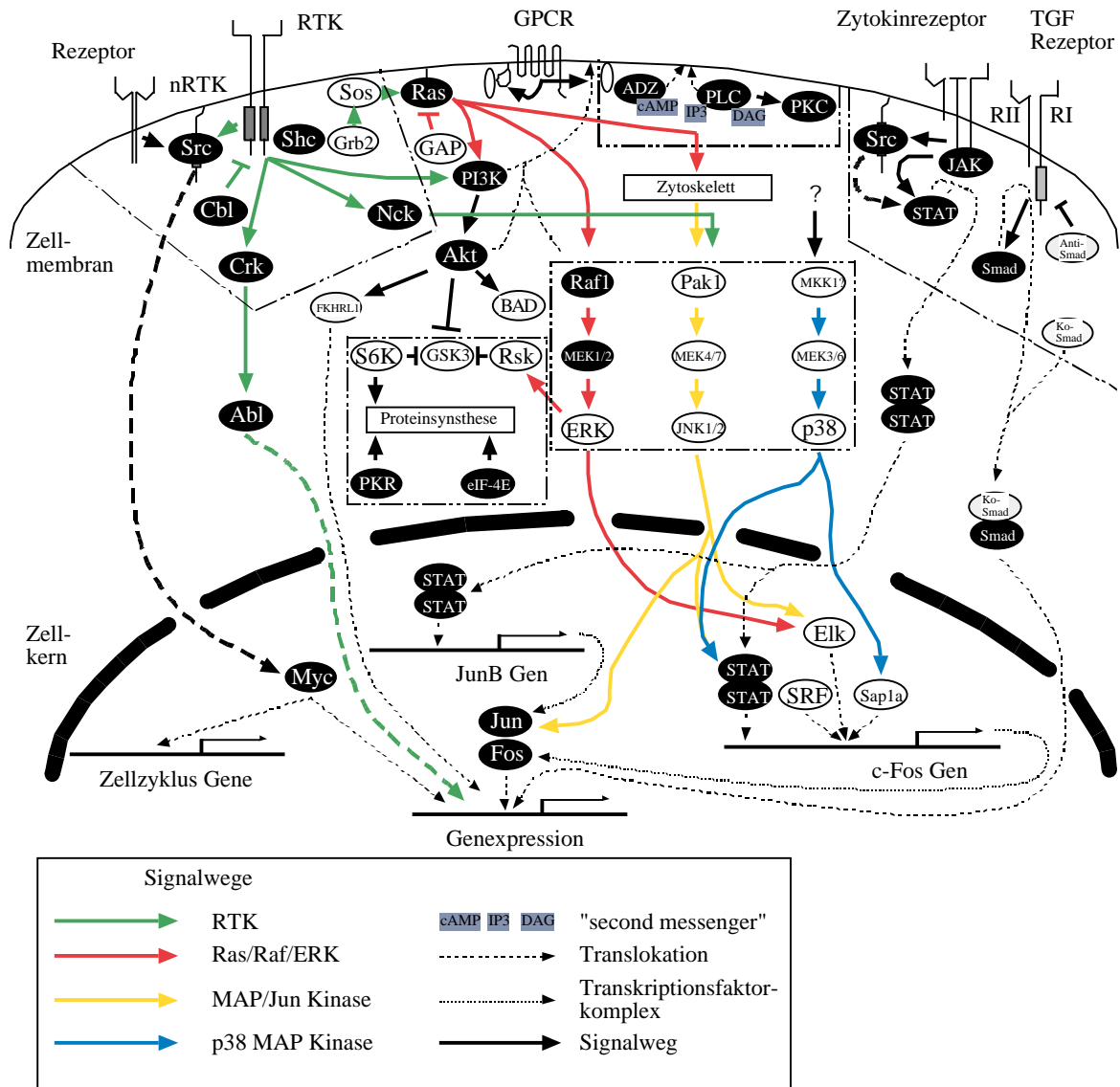
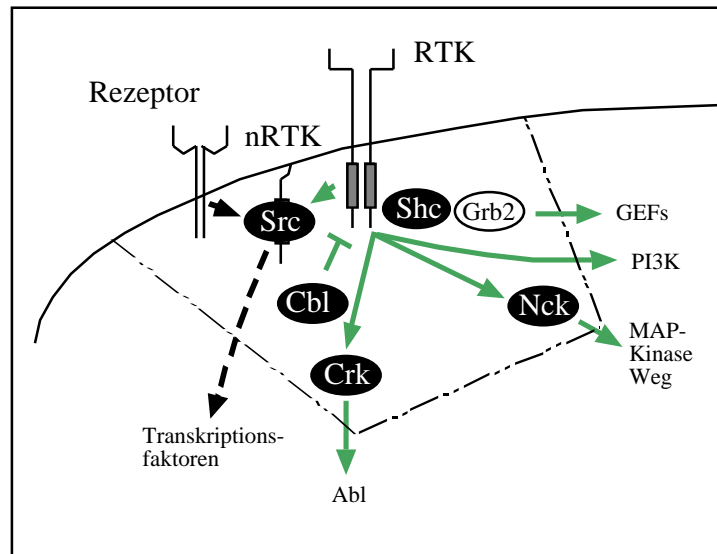


Abb. 2 a: Übersicht der Signaltransduktionsmechanismen (modifiziert nach Hunter, 1997)

Symbole mit dunklem Hintergrund sind als Onkoproteine, Symbole mit weißem Hintergrund als Tumorsuppressorproteine identifiziert worden. Proteine, denen (noch) keine von beiden Eigenschaften zugeordnet werden konnte, haben Symbole mit gepunktetem Hintergrund. Die Abkürzungen werden im Text erläutert. Durchgezogene Linien mit Pfeilspitzen bedeuten eine direkte Aktivierung im Signalweg. Nicht durchgezogene Linien mit Pfeilspitzen bedeuten eine indirekte Aktivierung im Signalweg. Hemmende Einflüsse sind durch ein T dargestellt. Gut charakterisierte Signalkaskaden sind durch gleichfarbige Pfeile gekennzeichnet. Die gepunkteten Kästen fassen funktionell ähnliche Signalwege zusammen (siehe Text). Die gepunkteten Linien zeigen die Bewegung der Proteine in der Zelle in Pfeilrichtung. Botenstoffe ("second messenger") sind grau unterlegt. Die Regulation des junB Gens und des c-fos Gens sind wegen ihrer Bedeutung für die Zellzyklusregulation herausgegriffen worden.

Abb. 2 b: Signalwege, die von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und nicht-Rezeptortyrosinkinasen (nRTK) ausgehen

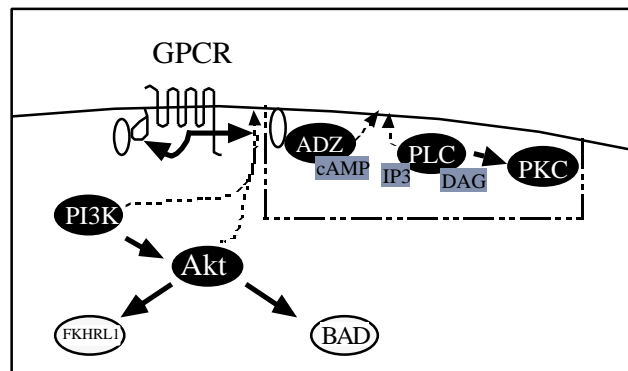
Ausschnitt aus Abb. 2 a rechts oben. Die gepunkteten Linien fassen funktionell ähnliche Signalwege zusammen und sind aus Abb. 2 a übernommen worden.



Der durch Rezeptortyrosinkinasen (Abb. 2 b, RTK) und die rezeptor- oder membran-assoziierten Tyrosinkinasen (Abb. 2 b: nRTK, z. B. Src) initiierte Signalweg gehört zu den am besten untersuchten. In beiden Fällen wird das Signal durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden an den Rezeptor eingeleitet, worauf sich Rezeptormoleküle zu Komplexen zusammenlagern. Als Folge können die intrazellulären Kinasedomänen des Rezeptorproteins entweder direkt Tyrosinreste an benachbarten Proteinen phosphorylieren (Abb. 2 b links, Resh, 1993) oder im Rezeptorkomplex assoziierte Tyrosinkinasen werden aktiv und phosphorylieren fremde und eigene Tyrosinreste (Abb. 2 b, Rudd et al., 1993). Die so generierten Phosphotyrosinreste bilden einen Anker für signalweiterleitende Proteine (Abb. 2 b, z. B. Shc, Nck, Cbl, Grb2), die über ihre SH2-Domäne Phosphotyrosinreste binden können (Kuriyan et al., 1999). Durch Phosphotyrosin-phosphatasen kann diese Signalkaskade an mehreren Stellen moduliert oder unterbrochen werden (Abb. 2 b, grüne Reaktionspfeile, Streuli, 1996). Eine weitere Regulation findet in Form einer gezielten Internalisierung des aktivierten Rezeptor-Liganden-Komplexes durch Endozytose statt (Luttrell et al., 1999).

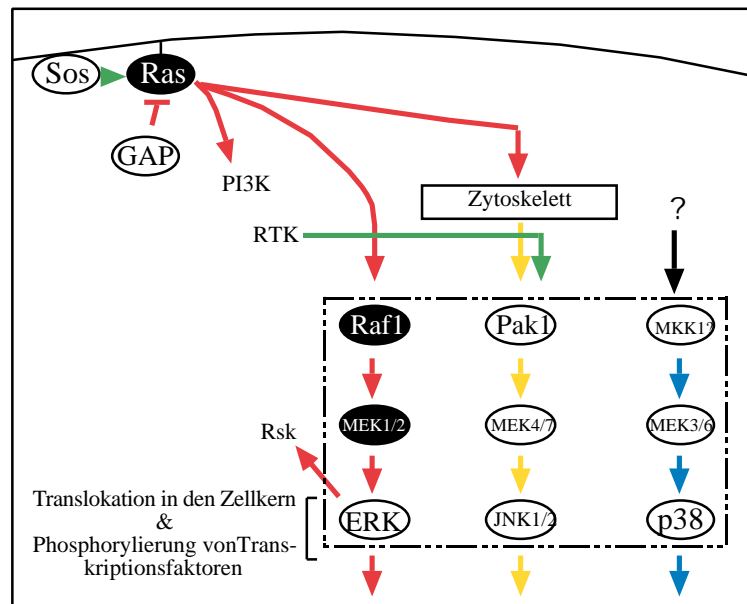
Abb. 2 c: Signalkomplexe an der Zellmembran und "second messenger" Systeme

Ausschnitt aus Abb. 2 a Mitte oben. Die gepunkteten Linien fassen funktionell ähnliche Signalwege zusammen und sind aus Abb. 2 a übernommen worden.



Durch die Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an die innere Fläche der Zellmembran wird ein Signalkomplex aufgebaut, welcher sowohl der erste Schritt zu einer Signalintegration als auch zu einer Aufspaltung des primären Signals in mehrere intrazelluläre Wege ist (Schwartz et al., 1999). Hierbei werden durch Enzyme häufig kleine Signalmoleküle innerhalb der Zelle freigesetzt, die man in Anlehnung an das primäre Ereignis Ligandenbindung als sekundäres Signalereignis d. h. als „second messenger“ bezeichnet. Bekannte „second messenger“ sind cAMP, IP3, DAG, und Kalziumionen (Abb. 2 c). Die „second messenger“ lösen i. d. R. innerhalb der Zelle weitere Reaktionen aus. Ein Beispiel ist der Weg über die Phosphoinositid-3-phosphat-Kinase (PI3K), der unmittelbar zur Generierung von Inositol-3-phosphat führt (IP3, Abb 2 c. links, Hinchliffe et al, 1997). Indirekt wird dadurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht (Abb. 2 c links, Scharenberg et al. , 1998), was beispielsweise zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT führt (nicht in Abb. 2 c, Timmerman et al., 1996) und die Proteinkinase B stimuliert (Abb. 2 c, PKB oder Akt), Letztere kann z. B. durch Serin/Threoninphosphorylierung des Bad-Proteins und des FKHRL1 Transkriptionsfaktors Apoptose inhibieren (Abb. 2 c Mitte links, Downward, 1998, Brunet et al., 1999, zur Funktion von Bad siehe Möröy et al., 1996). Eine weitere unmittelbare Folge des entstandenen Signalkomplexes ist beispielsweise die Aktivierung der Proteinlipase C (Abb. 2 c, PLC) und der Serin/Threoninproteinkinase C (Abb. 2 c PKC, Newton, 1997). Über weitere Adapterproteine kann auch aus einem Rezeptorkomplex eine Verbindung zu monomeren G-Proteinen hergestellt werden (Abb. 2 d Mitte, Luttrell et al., 1999).

Abb. 2 d: Signaltransduktion durch das Ras-Protein und den MAP-Kinase Weg
Ausschnitt aus Abb. 2 a Mitte oben. Die gepunkteten Linien fassen funktionell ähnliche Signalwege zusammen und sind aus Abb. 2 a übernommen worden.



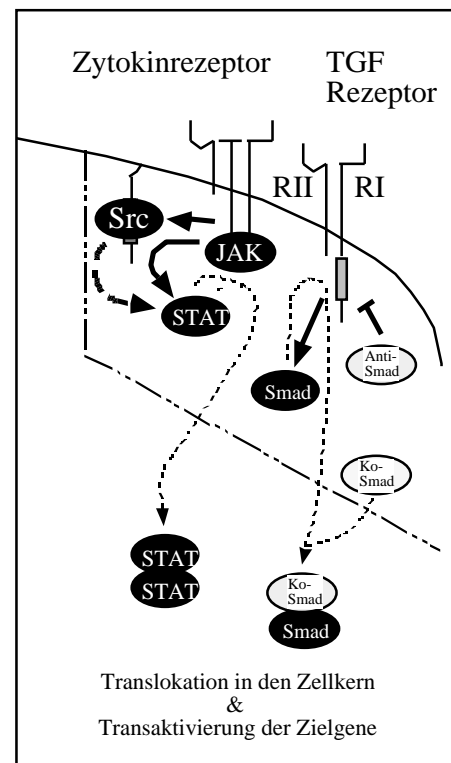
Ein bekannter Vertreter der monomeren G-Proteine ist das Ras-Protein, das u. a. über den „MAP-Kinase“ Weg (mitogen activated protein kinase) die Expression des „immediate-early“ Genes c-fos stimulieren kann (Abb. 2 d Kasten, Garrington et al., 1999, zur Übersicht des MAP-Kinase Weges und der Nomenklatur der Kinasen; Dhanasekaran et al., 1998, zur Bedeutung der „immediate early“ Gene für die Induktion des Zellzyklus siehe Müller et al., 1993). Dieser Signaltransduktionsweg ist u. a. zwischen Hefe und Säugern hochkonserviert (Waskiewicz et al. 1995) und kann zur Vereinfachung nach heutigem Wissen in mindestens drei parallele Stränge unterteilt werden. Der erste Strang läuft über die Proteinkinasen Raf, Mek1/2, Erk1/2, vermittelt das Signal von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in den Zellkern und beeinflusst darüberhinaus mehrere intrazelluläre Enzyme (Abb. 2 d, rote Pfeile, Garrington et al., 1999). Der zweite Strang vermittelt zusätzlich zu den oben genannten Signalen noch die für zellulären Stress, (Osmotischer Schock, Genotoxischer Stress), wird über monomere G-Proteine, die den Aufbau des Zytoskelettes steuern, aktiviert und läuft über Pak1, Mkk4/7, und Jnk1/2 (Canman et al., 1996). Seine Aktivierung kann neben Zellwachstum und Zelldifferenzierung auch zum Zelltod (Apoptose) führen. (Abb. 2 d, gelbe Pfeile, Mitte rechts, Garrington et al., 1999, Pritchard et al., 1997). Der dritte Strang mit den beteiligten Proteinkinasen Pak1/Tak1/Mkk1, Mkk3/6 und p38 ist Überträger von Signalen für zellulären Stress und wirkt z. B. auf die Zytokinproduktion der Zelle. (Abb. 2 d, blaue Pfeile, Garrington et al., 1999, Su et al., 1996, siehe 1.5). Die Spezifität der am MAP-

Kinase Weg beteiligten Proteinkinasen wird vermutlich durch Gerüstproteine garantiert, die ähnlich wie die oben erwähnten Adapterproteine die entsprechenden Enzyme zu Multienzymkomplexen zusammenbringen (Garrington et al., 1999).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Abb. 2 c, GPCR, G-Protein coupled receptor) stellen eine weitere funktionelle Klasse an extrazelluläre Liganden-bindenden Rezeptoren dar. Sie haben eine hochkonservierte Struktur, die hauptsächlich aus 7 die Zellmembran durchlaufenden Transmembrandomänen besteht (Abb. 2 c, Bourne, 1997). Extrazelluläre Ligandenbindung verursacht bei ihnen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran die Aufspaltung eines assoziierten trimeren G-Proteins in eine GTP-tragende monomere α -Untereinheit und in eine dimere $\beta\gamma$ -Untereinheit (Bourne, 1997). Beide Untereinheiten sind analog zu den Tyrosinkinasen das Gerüst um mit weiteren Rezeptoren eine Plattform zu bilden, an die Adapterproteine und weitere Enzyme, z. B. Adenylatzyklase (ADZ, Abb. 2 c), PKC oder PLC angelagert werden (Abb. 2 c, Tsunoda et al., 1998, Lutrell et al., 1999). Die Aktivität der monomeren Untereinheit wird dabei über den Status des gebundenen Guaninnukleotids kontrolliert. Ist dieses als GTP gebunden und nicht dissoziiert, ist die Untereinheit aktiv und kann im Falle des Ras-Proteins verschiedene Signalwege anschalten (Abb. 2 d, rote Pfeile, Rommel et al., 1998). Ist das Guaninnukleotid in ein Nukleotid (GDP) und einen anorganischen Phosphatrest dissoziiert, so ist die α -Untereinheit inaktiv. Die Dissoziation des GTPs und der Austausch des GDPs und des Phosphatrests gegen ein GTP wird dabei durch assoziierte Proteine sog. GEFs (Guanine-nucleotide exchange factors, Abb. 2 d, Sos-Protein) und GAPs (GTPase activating proteins, Abb. 2 d) gesteuert (Rommel et al., 1998, Downward, 1998). G-Proteine bilden durch dieses System einen Schalter in der Zelle, der je nach Zustand des Guaninnukleotids in zwei Stellungen stehen kann.

Abb. 2 e: Signalwege, die unmittelbar in den Zellkern führen

Ausschnitt aus Abb. 2 a links oben. Die gepunkteten Linien fassen funktionell ähnliche Signalwege zusammen und sind aus Abb. 2 a übernommen worden.



Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Signaltransduktionssystemen, bei denen über eine Kaskade ein Signal in vielen Schritten in den Zellkern geleitet wird, stellen das TGF / SMAD (transforming growth factor / s mothers against decapentaplegic) und das JAK / STAT System (Janus kinase / signal transducers and activators of transcription) zwei Signalwege dar, bei denen an der Innenseite der Zellmembran Proteine phosphoryliert werden, daraufhin multimerisieren, in den Zellkern transportiert werden und schließlich unmittelbar als Transkriptionsfaktoren wirken (Abb.2 e rechts, Kretzschmar et al., 1998, Horvath et al, 1997). Der TGF Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten (R I und R II, Horvath et al., 1998), wobei die Untereinheit R I nach extrazellulärer Ligandenbindung und Dimerisierung mit Untereinheit RII als Serin/Threoninkinase SMAD-Proteine phosphoryliert. Die rezeptor-aktivierten SMAD-Proteine binden Ko-SMADs (Kretzschmar et al., 1998) und wirken im Zellkern als transkriptionelle Aktivatoren (Abb. 2 e). Die Entstehung der aktiven SMAD-Komplexe kann durch Anti-SMAD-Proteine, die um die Rezeptorbindestellen konkurrieren, aber nicht phosphoryliert werden können, und durch den MAP-Kinase Weg, der aktive SMAD-Komplexe durch Phosphorylierung deaktivieren kann, verhindert werden (Kretzschmar et al., 1998). Das JAK / STAT System bildet ein komplexes Netzwerk aus Rezeptoren, intrazellulär assoziierten Tyrosinkinasen (Abb. 2 e,

JAK) und im Zytoplasma vorkommenden latenten Transkriptionsfaktoren (Abb. 2 e, STAT, Schindler et al., 1995). Über das JAK / STAT System werden vor allem Wachstums- und Differenzierungssignale von Zytokinen und Wachstumsfaktoren übertragen. Die Rezeptoren bestehen aus 1, 2 oder 3 Untereinheiten (, ,). Nach Bindung eines extrazellulären Liganden werden die intra-zellulär assoziierten JAK Tyrosinkinasen aktiv und phosphorylieren zunächst Tyrosinreste der zytoplasmatischen Rezeptoranteile. Diese Phosphotyrosine bilden nun Andockstellen für STAT-Proteine aus dem Zytoplasma, welche ebenfalls von den JAKs an Tyrosinresten phosphoryliert werden (Hoey et al., 1998). Phosphorylierte STAT-Proteine dimerisieren über ihre SH2-Proteindomäne (Kuriyan et al., 1999, Hoey et al., 1998), werden in den Zellkern transportiert und können direkt oder in Verbindung mit Ko-Faktoren als transkriptionelle Aktivatoren wirken. Die Spezifität und Diversität des JAK / STAT Systems wird durch die Art der Rezeptoren in Kombination mit den 4 bisher bekannten JAKs und den 6 bisher bekannten STATs garantiert (Horvath et al., 1998). Die Regulation des JAK / STAT Systems und seine Zielgene werden in 1.5 genauer erläutert.

Generell finden sich in den Signaltransduktionswegen bestimmte Prinzipien wieder:

Erstens führt eine Ligandenbindung dazu, daß durch Phosphorylierung von Tyrosin- bzw. Serin/Threoninresten Andockstellen für Proteine aus dem Zytoplasma an der Innenseite der Zellmembran entstehen. Dadurch können diese Proteine rekrutiert und aktiviert werden (Barinaga, 1999) Es sind inzwischen einige Proteindomänen bekannt, die als Module phosphorylierte Aminosäurereste innerhalb eines Proteins binden (Sudol, 1998).

Zweitens wird ein primäres Ereignis, wie z. B. eine Rezeptor-Liganden Interaktion verstärkt, indem eine enzymatische Kaskade eingeschaltet wird. Es bilden sich „multimolekulare Signalkomplexe“, welche das Signal auf verschiedene Reaktionswege aufteilen können (Signaldiversifikation), modulieren können (Signalmodulation), und verstärken können (Signalamplifikation) bis sie auf die Transkription verschiedener Zielgene wirken (Tsunoda et al., 1998, Spitzer et al., 1997, Weng et al., 1999). Die Spezifität des Signalweges wird dabei häufig durch eine "Kompartimentierung" garantiert (Mochly et al., 1995, Weng et al., 1999), wie z. B. über eine Koppelung durch Adapter- und Gerüstproteine (Schwartz et al., 1999). Als Alternative zu der oben beschriebenen Kaskade über mehrere Stationen die sich gegenseitig beeinflussen, gibt es bei einigen

Signaltransduktionswegen den direkten Weg in den Zellkern. Darüberhinaus kann auch die Transkriptionsmaschinerie über Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren Signale auf transkriptioneller Ebene verarbeiten (als Bsp. Abb. 2 a, c-fos Promotor, siehe auch Torchia et al., 1998, Janknecht et al., 1999). Die gesamte Betrachtung macht deutlich, daß die korrekte Signalübertragung essentiell für die physiologische Funktion des Organismus ist (Dyson et al., 1999).

1.3 Tumorgenese als Folge fehlregulierter Signalverarbeitung

Zu den wesentlichen Erkenntnissen der letzten Jahre in der Tumorforschung gehört die Tatsache, daß Krebs eine genetische Ursache hat (Vogelstein et al., 1993). Im Laufe der Zeit hat sich herausgestellt, daß nicht eine bestimmte Mutation alleine zu einem Tumor führt. Nach Schätzungen sind es 6 Mutationsschritte (Peto et al., 1975), die zu einem metastasierenden Tumor führen. Diese Mehrschritthypothese ist durch verschiedene Experimente an Modell-systemen nachgewiesen worden (Vogelstein et al., 1993, Kinzler, et al., 1998). Der Fortschritt auf diesem Gebiet wurde anfänglich vor allem durch die Analyse des Genoms von tumorinduzierenden RNA- und DNA-Viren erzielt. Das Genom vieler Retroviren enthält aktivierte Homologe zu zellulären Genen, sog. virale Onkogene, die zu einer malignen Transformation der infizierten Zelle führen können. Die Homologe in Zellen nennt man analog dazu Proto-Onkogene. Durch die Analyse des Genoms einiger DNA-Viren fand man hingegen Proteine, die Tumorgenese durch das Abschalten zellulärer Kontrollgene induzieren konnten (Hinds et al., 1994, Nevins, 1994, Lanfranccone et al., 1994). Offensichtlich spielt die deregulierte Expression zellulärer Gene - der Proto-Onkogene - sowie das Abschalten zellulärer Kontrollgene - der Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle während der Tumorgenese (Dyson et al. 1999). In Abb. 3 sind in einer Tabelle einige bekannte Proto-Onkogene mit ihrer Funktion, der Quelle des Virus, und die Art des induzierten Tumors aufgeführt.

Onkogen	Proto-Onkogen Funktion	Quelle des Virus	Art des virus induzierten Tumors
abl	Proteintyrosinkinase	Maus, Katze	Pre B-Zellleukämie Sarkom
erb-B	Rezeptor für EGF Rezeptor-proteintyrosinkinase	Huhn	Erythroleukämie, Fibrosarcom
fes	Proteintyrosinkinase	Katze, Huhn	Sarkom
fms	Rezeptor für M-CSF Rezeptor-proteintyrosinkinase	Katze	Sarkom
fos, jun	Transkriptionsfaktoren	Maus, Huhn	Osteosarkom, Fibrosarkom
kit	Proteintyrosinkinase	Katze	Sarkom
raf	Serin/Threoninproteinkinase	Huhn, Maus	Sarkom
mpl	Rezeptor für Thrombopoetin	Maus	erythroide, myeloische, megakaryozytäre Leukämie
myc	Transkriptionsfaktor	Huhn	Sarkom, Myelozytom, Karzinom
H-ras	G-Protein	Ratte	Sarkom, Erythroleukämie
K-ras	G-Protein	Ratte	Sarkom, Erythroleukämie
rel	Transkriptionsfaktor aus der NF B Familie	Truthahn	Retikuloendotheliosis
sis	B-Kette des Rezeptors für PDGF Rezeptorproteintyrosinkinase	Affe	Sarkom
src	Proteintyrosinkinase	Huhn	Sarkom

Abb. 3: Tabelle von Onkogenen und ihren Effekten

Erläuterung der Tabelle im Text. Benutzte Abkürzungen: EGF = engl. Epidermal growth factor, M-CSF = engl. Macrophage colony-stimulating factor, PDGF = engl. Platelet-derived growth factor. Abbildung modifiziert nach Alberts et al., 1994

Auffällig an der Auflistung in Abb. 3 ist, daß die meisten dort genannten Gene eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen und häufig Zellproliferation kontrollieren (Sherr, 1996, Dyson et al., 1999). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt man, wenn man Abb. 2 a unter dem Gesichtspunkt betrachtet, daß die Symbole mit dunklem Hintergrund Proteine sind, die von Proto-Onkogenen kodiert werden und die Symbole mit weißem Hintergrund jene Proteine, die von Tumorsuppressorgenen kodiert werden (Hunter, 1997). Offensichtlich wird der Lebenszyklus einer Zelle über exogene Wachstumsfaktoren bestimmt, deren Signale über Mechanismen geregelt sind, die auf die Zellzyklusmaschine wirken und z. B. in Abb. 2 a beschrieben sind (Marx, 1994). Ursprünglich nahm man an, daß die Zellzyklusmaschine nicht mehr gestoppt werden kann, und eine Zellteilung vollendet, sobald sie gewisse Kontrollpunkte ("Checkpoints") durchlaufen hat (Müller et

al., 1993). Eine neuere Definition versteht unter Kontrollpunkten jedoch biochemische Reaktionswege, die die Abhängigkeit der einzelnen Zellzyklusschritte von einer bestimmten Reihenfolge sicherstellen (Elledge, 1996). Beispiele für diese Kontrollpunkte sind ein "DNA-Schaden Kontrollpunkt", der sicherstellt, daß nur intakte DNA repliziert wird, und ein "Spindel Kontrollpunkt", der sicherstellt, daß die Mitose-Spindel korrekt aufgebaut wird, bevor die Karyokinese beginnt (Elledge, 1996). Wenn Wachstumssignale von einer Zelle fehlinterpretiert werden und die endogenen Kontrollpunkte durchbrochen werden, weil die Signaltransduktion fehlreguliert ist, kann das zu genetischer Instabilität führen (Paulovich et al., 1997). Möglicherweise akkumulieren so Schäden im Genom, die zu weiteren genetischen Veränderungen führen, so daß die internen Kontrollpunkte komplett ausgeschaltet werden und weder Schadensreparatur noch programmierter Zelltod stattfinden (Weinert, 1997, Weinert, 1998). Eine genetische Prädisposition, bei der ein Allel eines kritischen Kontrollgens schon mutiert ist, kann diesen Vorgang wesentlich beschleunigen (Vogelstein et al., 1993). Fehlerhafte DNA Reparatur führt zu weiteren Schäden (Lengauer et al., 1998). Letztendlich werden die Zellen selektioniert, die sich ungehemmt teilen, weil kritische Komponenten der Signaltransduktionsmaschinerie mutiert sind und damit außer Kontrolle geraten (Lewin, 1991, Hunter, 1997, Pennisi 1998). Wie an Abb. 2 a zu sehen ist, können sich die Mutationen auf jeder Ebene des Signaltransduktionsnetzwerkes ereignen und so zur malignen Transformation der Zelle führen.

1.4 Das Immunsystem als Modell einer komplexen Regulation

Paradigmatisch für das Zusammenwirken von komplexen Regulationsmechanismen ist das Immunsystem von höher entwickelten Säugern. Es ist für experimentelle Untersuchungen leicht zugänglich, seine Zellen lassen sich vergleichsweise einfach kultivieren und aufgrund vieler mit dem Immunsystem zusammenhängender Krankheiten sowie vieler das Immunsystem betreffender Tumore ist seine wissenschaftliche Untersuchung auch von praktischem Wert. Daher gehört das Immunsystem zu den am besten charakterisierten "Organen" (Clevers et al., 1996).

Das gesamte Immunsystem setzt sich aus einer Vielzahl spezialisierter Zellen zusammen, die sich prinzipiell fast überall im Körper aufhalten können, jedoch i. d. R. auf wenige primäre und sekundäre lymphatische Organe sowie den Blutkreislauf konzentriert sind (Linsley et al., 1999). Seine Aufgabe ist es, den Organismus vor Krankheiten zu bewahren, die sowohl exogene als auch endogene Ursachen haben können. Es entwickelt sich schon sehr früh während der Embryogenese als Teil des hämatopoetischen Systems (Orkin, 1996). Die erste primitive Hämatopoese findet zunächst im Dottersack statt, später besiedeln die hämatopoetischen Stammzellen während der Embryonalentwicklung die fetale Leber und danach das fetale Knochenmark. Im adulten Lebewesen ist die Hämatopoese auf die primären lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus beschränkt, wobei aber eine weitere Zellreifung in sekundären lymphatischen Organen stattfindet (Orkin, 1996, Benoist, et al., 1997).

Funktionell lässt sich das Immunsystem in einen unspezifischen Teil, der im wesentlichen aus verschiedenen Freßzellen und dem Komplementsystem besteht, und einen spezifischen Teil, der aus spezialisierten Zellen besteht, unterteilen. Für die weitere Betrachtung ist dieser zweite Anteil wichtig, der sich im adulten Organismus aus zwei Zelltypen zusammensetzt. Die B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen B-Zellrezeptor, dessen variabler Anteil hochspezifisch freies Antigen binden kann. Nach Aktivierung produzieren B-Zellen lösliche Antikörper, die Antigen durch Bindung neutralisieren. T-Zellen, die den T-Zellrezeptor tragen, können Antigene nur dann mit dem T-Zellrezeptor detektieren, wenn sie sie mit Hilfe von Antigen-präsentierenden Zellen in einer bestimmten Form präsentiert bekommen. Wenn T-Zellen über Antigenkontakt aktiviert werden (siehe 1.4), können sie entweder kranke Körperzellen direkt eliminieren (zytotoxische T-Zellen) oder sie unterstützen die Immunantwort, indem sie Botenstoffe (Zytokine, siehe 1.4) produzieren (T-Helferzellen).

Je nachdem ob T-/B-Zellen schon an einer Immunantwort beteiligt waren, können sie in zwei Gruppen unterschieden werden. Die erste, neue oder „naive“ Gruppe besteht aus den gerade gereiften immunkompetenten Zellen, die zweite oder Gedächtnisgruppe aus den Zellen die bereits an einer Immunantwort beteiligt waren (Benoist et al., 1997). Für die Reifung im Knochenmark sind sowohl endogene Faktoren, die die Transkription bestimmter Zielgene regulieren und deren Kombination eine Zellidentität schafft (Cross et al., 1997, Tenen et al., 1997), als auch exogene Faktoren, die lokal in Form von direkten

Zell-Zell Kontakten und löslichen Zytokinen auf die reifende Zelle wirken (Baird et al. 1999, vergleiche auch 1.2), wichtig. Beide Komponenten arbeiten vermutlich Hand in Hand, während sich die reifende Zelle auf eine bestimmte Aufgabe spezialisiert. Wenn nur ein Bestandteil einer Komponente durch gezielte Mutagenese in Mäusen ausgeschaltet wird, kann es zu erheblichen Defekten in der Entwicklung des Immunsystems kommen (Baird. et al., 1999, Clevers et al., 1996, Tybulewicz 1998). Zu ähnlichen Ergebnissen ist man bei der Untersuchung der T-Zellreifung im Thymus gekommen (Willerford et al., 1996, Clevers et al., 1996, Tybulewicz 1998). Die Zellreifung in primären lymphatischen Organen ist somit ein gutes Modell für Signaltransduktion, in dem die Wirkung von exogenen Signalen auf die Transkription von bestimmten Zielgenen und die damit einhergehende Veränderung der Zellphysiologie gezeigt wird (Nemazee et al., 1999).

Neben ihrer Funktion in der T-Zell bzw. B-Zellreifung haben die T/B-Zellrezeptoren die wichtige Aufgabe der Zellaktivierung in einer Immunreaktion nach Antigenerkennung des Rezeptors (Linsley et al. 1999). An einer Modulation der Immunreaktion sind noch weitere Rezeptoren beteiligt, die ebenfalls extrazelluläre Signale weiterleiten (Linsley et al. 1999, Janeway, 1999). In Abb. 4 sind exemplarisch der T-Zellrezeptor sowie der Zytokinrezeptor für Interleukin 6 und die von ihnen ausgehenden Signalwege dargestellt (vergleiche auch Abb. 2 a). Der B-Zellrezeptor bzw. andere Zytokinrezeptoren geben Signale auf vergleichbare Art weiter (Neuberger, 1997, Corey et al., 1999)

Der T-Zellrezeptorkomplex besteht aus einer ligandenbindenden α / β -Kette und signalweiter-leitenden assoziierten γ - Ketten, δ - Ketten, welche auch CD3 Untereinheit genannt wird, und ϵ - Ketten. Die assoziierten Transmembranproteine besitzen in ihrem zytoplasmatischen Anteil Tyrosinreste, die nach T-Zellrezeptoraktivierung phosphoryliert werden und daher ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation sequence motif) genannt werden (Qian et al., 1997). Der erste Phosphorylierungsschritt wird dabei vermutlich im Falle des T-Zellrezeptors von der membran-assoziierten Tyrosinkinase Lck übernommen. Dadurch bindet u. a. die zytoplasmatische Tyrosinkinase ZAP-70 über ihre SH2-Domänen an diese ITAMs und phosphoryliert nun weitere potentielle ITAMs innerhalb des Rezeptorkomplexes (van Leeuwen et al., 1999, vergleiche auch Abb. 2 a). Es entstehen weitere Andockstellen und es bildet sich ein „multimolekularer Komplex“ um den aktivierten T-Zellrezeptor (Wange et al., 1996). Von dem Komplex gehen im wesentlichen drei Signale in das Zellinnere (Abb. 4).

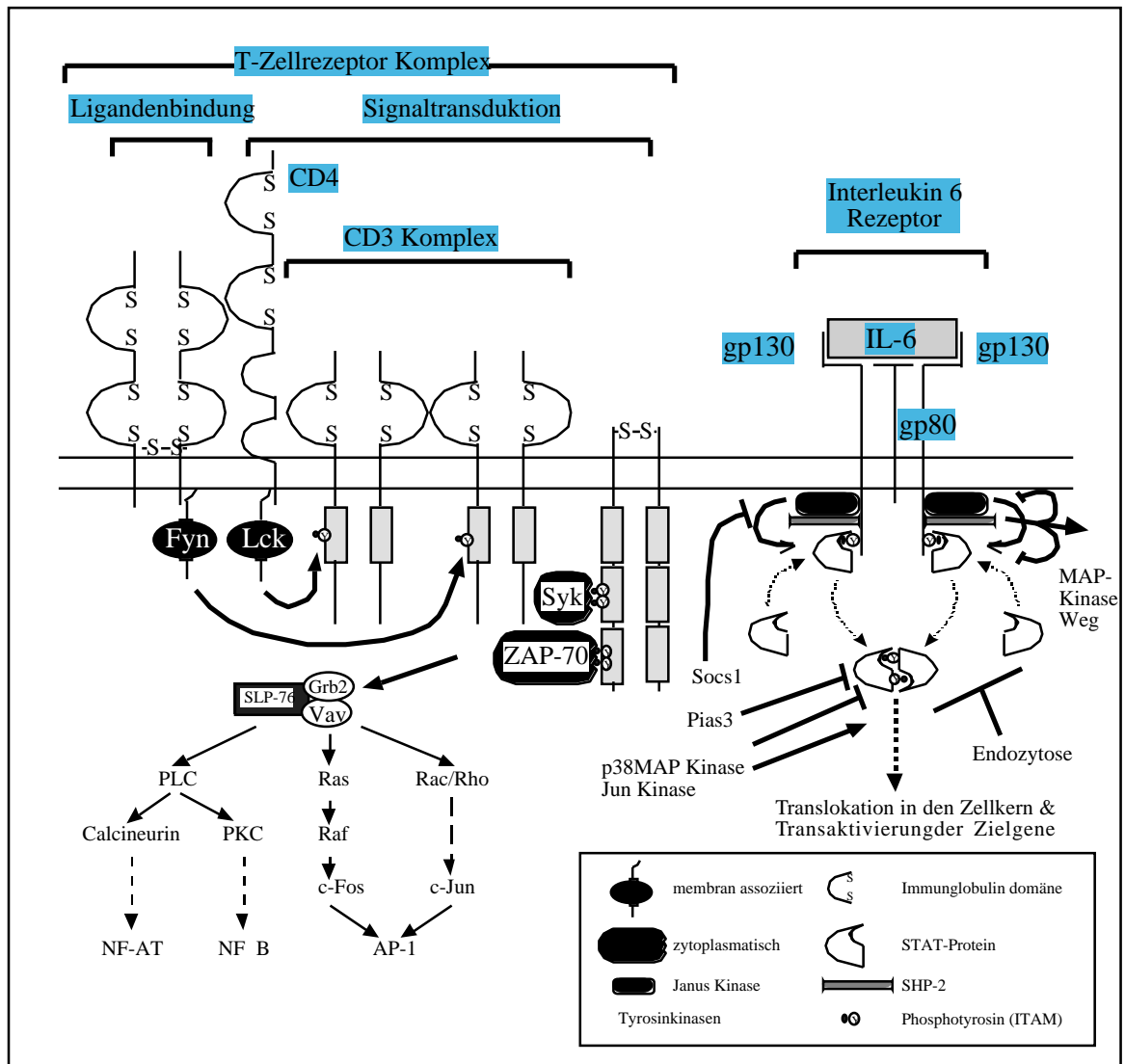


Abb. 4: Der T-Zellrezeptor und der Interleukin-6-Rezeptor in der Signaltransduktion

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den T-Zellrezeptorkomplex mit seinen einzelnen Komponenten. Rechts ist der Interleukin-6-Rezeptor und die von ihm ausgehenden Signalwege dargestellt (modifiziert nach Qian et al., 1997, Heinrich et al., 1998). Die Abkürzungen werden im Text erläutert.

Erstens wird IP₃ freigesetzt, welches über einen Kalziumioneneinstrom den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert, der die Transkription des IL-2 Gens stimuliert. Als zweites wird über das Ras-Protein der MAP-Kinase Weg stimuliert und über das SLP-76 Protein das Aktinskelett der T-Zelle verändert (van Leuwen et al., 1999, vergleiche auch Abb. 2 a). Drittens wird über PKC der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Mercurio et al., 1999). Es ist zu vermuten, daß neben den schon erwähnten Signaltransduktionswegen noch weitere existieren, die das T-Zellrezeptorsignal in das Zellinnere weiterleiten.

Im Gegensatz zu den B-/T-Zellrezeptoren gehören Zytokinrezeptoren zu den Wachstumsfaktorrezeptoren, leiten wie diese Wachstums- und Differenzierungssignale in die Zelle weiter, besitzen aber anders als viele Wachstumsfaktorrezeptoren keine eigene Tyrosinkinaseaktivität (Gonda et al., 1997, vergleiche auch 1.2). Daher bilden sie eine eigene Superfamilie, die wiederum nach verschiedenen Kriterien in Unterfamilien aufgeteilt werden kann. Alle Zytokinrezeptoren haben eine ähnliche extrazelluläre Struktur als Basis (Bazan, 1990, Gonda et al., 1997), und sollen hier aufgrund der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten in drei Unterfamilien aufgeteilt werden (Ihle, 1995). Die erste Unterfamilie umfaßt alle Rezeptoren, die nach Aktivierung durch Ligandenbindung aus einem Homodimer bestehen. Beispiele für diese Unterfamilie sind der Erythropoetinrezeptor oder der Prolaktinrezeptor (Gonda et al., 1997).

Durch Ligandenbindung aktivierte Zytokinrezeptoren, die aus einem α / β Heterodimer bestehen, bilden die zweite Unterfamilie. Die α -Untereinheit ist nur an der Ligandenbindung und nicht an der Signaltransduktion beteiligt, die mit Hilfe der β -Untereinheit stattfindet. Beide Untereinheiten sind jedoch für eine hochaffine Ligandenbindung nötig (Abb. 4 rechts, Bagely et al., 1997, Gonda et al., 1997). Häufig teilen sich Rezeptoren für verschiedene Zytokine die gleiche β -Untereinheit und unterscheiden sich nur in der α -Untereinheit. Daher wird die β -Untereinheit auch γ genannt (γ für common = gemeinsam, Bagely et al., 1997, Heinrich et al., 1998). Als Beispiel für diese Unterfamilie kann der Interleukin-5-Rezeptor oder der Interleukin-6-Rezeptor genannt werden.

Die dritte Unterfamilie besteht aus Rezeptoren mit drei Untereinheiten (α , β , γ), wie z. B. der Interleukin-2- oder der Interleukin-4-Rezeptor. Der $\alpha\beta\gamma$ Komplex kann dabei das Zytokin nur mit mittlerer Affinität binden, ist aber für die Signaltransduktion entscheidend.

Erst der γ / δ Komplex bildet einen hochaffinen Rezeptor. Ebenso wie bei der zweiten Unterfamilie teilen sich auch hier Rezeptoren für verschiedene Zytokine die gleiche γ -Untereinheit, die daher analog zu ϵ als γ -Kette bezeichnet wird (Gonda et al., 1997). Menschen mit XSCID (x-linked severe combined immunodeficiency) haben häufig eine Mutation in der γ -Kette, die X-chromosomal vererbt wird. Durch die Mutation wird eine Assoziation von Jak3 mit der γ -Kette behindert bzw. u. U. komplett aufgehoben. Bei anderen Formen von SCID (severe combined immunodeficiency) sind Mutationen im jak3-Gen beschrieben worden (Aringer et al., 1999). Neben der Unterteilung nach der Anzahl der unterschiedlichen am Rezeptor beteiligten Untereinheiten, können die Zytokinrezeptoren der zweiten und dritten Unterfamilie auch nach den gemeinsam genutzten Untereinheiten unterteilt werden. Beispielsweise gehören dann alle Zytokinrezeptoren, bei denen die γ -Untereinheit aus dem Glykoprotein gp130 besteht, zu der Interleukin-6-Rezeptorfamilie (Abb. 4 rechts, Heinrich et al., 1998).

Die Signale, die von aktivierten Zytokinrezeptoren ausgehen, sind in Abb. 2 a bereits allgemein erläutert worden. Abb. 4 zeigt nun im Detail die Signaltransduktion des Interleukin-6-Rezeptors, der nach Ligandenbindung aus einer γ -Untereinheit (gp80) und zwei β -Untereinheiten (gp130) besteht. Es ist bis heute jedoch noch nicht klar, wie dieser Vorgang auf molekularer Ebene abläuft und ob letztendlich nicht Signalkomplexe einer höheren Ordnung entstehen. Es gibt z. B. Hinweise, daß aktivierte Interleukin-6-Rezeptoren als Hexamere (= 2 γ Einheiten) vorliegen (Bagley et al., 1997). Auch ist beschrieben worden, daß sich bei anderen Rezeptoren nach Dimerisierung nicht-kovalente und kovalente (=Disulfidbrücken) Bindungen ausbilden können (Bagley et al., 1997).

Im Falle des Interleukin-6-Rezeptors führt die Bildung des γ / β Komplexes zur Annäherung der zytoplasmatisch assoziierten JAKs (Jak1, Jak2, Tyk2) mit der Folge einer inter- oder intramolekularen Tyrosinphosphorylierung und einer vollständigen Aktivierung (Aringer et al., 1998). Welche der beteiligten JAKs eine entscheidende Rolle spielen ist nicht klar und ändert sich möglicherweise entsprechend der gewebespezifischen Expression der einzelnen JAKs. Außer Jak3, welches ausschließlich mit der γ -Kette (siehe oben) assoziiert ist, können die anderen JAKs mit verschiedenen Rezeptorketten assoziiert sein (Aringer et al., 1998). Jak1 scheint im Falle des Interleukin-6-Rezeptors jedoch eine Schlüsselrolle zu spielen und kann nicht durch andere JAKs substituiert werden (Heinrich et al., 1998). Die aktivierten JAKs phosphorylieren Tyrosinreste innerhalb des

zytoplasmatischen Anteils von gp130. Diese Phosphotyrosine bilden Andockstellen für verschiedene phosphotyrosin-bindende Proteine (siehe 1.2). Vor allem können im Falle des Interleukin-6-Rezeptors Stat1 und Stat3 über ihre SH2-Domäne an gp130 binden, werden ihrerseits von den assoziierten JAKs tyrosinphosphoryliert und bilden daraufhin Homodimere (möglicherweise auch Heterodimere) (Heinrich et al., 1998, Abb. 4 rechts). Die dimeren STAT-Proteine werden in den Zellkern transportiert und wirken dort als transkriptionelle Aktivatoren. Für eine Regulation der Aktivierung ist noch eine Serinphosphorylierung der transaktivierenden Domäne der STAT-Proteine wichtig (Heinrich et al., 1998, vergleiche Abb. 2 a, siehe auch unten). Neben den STAT-Proteinen bindet noch die Phosphotyrosinphosphatase Shp2 an die Phosphotyrosine von gp130. Shp2 wird vermutlich von Jak1 und/oder Jak2 durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Möglicherweise koppelt Shp2 über die Bindung des Adapterproteins Grb2 den MAP-Kinase Weg mit dem Interleukin-6-Rezeptor (zur Funktion von Adapterproteinen und Aktivierung des MAP-Kinase Weges vergleiche 1.2 und siehe unten), vielleicht ist die Phosphataseaktivität auch wichtig für die Deaktivierung des aktivierten Rezeptors durch Dephosphorylierung (Heinrich et al., 1998).

Die negative Regulation des JAK / STAT Weges ist in 1.2 bereits angesprochen worden. Prinzipiell kann nach heutigem Wissensstand das Signal auf 5 Ebenen reguliert werden. Erstens gehören zu den Zielgenen der STAT-Proteine die SOCS-Gene (suppressor of cytokine signalling), die für Inhibitorproteine des JAK / STAT Weges kodieren, welche die JAK Aktivität durch direkte Bindung der Kinase inhibieren (Abb. 4, Hoey et al., 1998, Aringer et al., 1998). Im Falle des Interleukin-6-Rezeptors handelt es sich um Socs1 (auch Jab oder Ssi-1 genannt, Endo et al., 1997). Zweitens können aktivierte STAT-Proteine vermutlich über den MAP-Kinase Weg serinphosphoryliert werden, und wirken dadurch je nach Kontext entweder als starke transkriptionelle Aktivatoren (Abb. 2 a, Abb. 4, Wen et al., 1995, Zachermann et al., 1999) oder werden inaktiviert (Jain et al., 1998). Es gibt Hinweise, daß für die Serin-phosphorylierung p38 und/oder JNK verantwortlich sind (Turkson et al., 1999, Lim et al., 1999, Kovarik et al., 1999). Drittens sind sog. PIAS-Proteine (protein inhibitor of activated SSTAT) identifiziert worden, die an tyrosinphosphorylierte STAT-Proteine binden können und dadurch deren DNA-Bindung verhindern (Abb. 4, Chung et al., 1997, Liu et al., 1998). Viertens ist die oben angesprochene Dephosphorylierung von aktivierten Rezeptoren eine Form der Regulation

und fünftens wird der Rezeptorkomplex nach Aktivierung offensichtlich sehr schnell durch Endozytose internalisiert und damit deaktiviert (Heinrich et al., 1998, vergleiche auch 1.2).

Es gibt experimentelle Hinweise, daß neben den JAKs auch noch membranassoziierte Tyrosinkinasen der Src-Familie bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren eine Rolle spielen (Taniguchi et al, 1995, siehe auch 1.2). In Zellen, in denen Mitglieder der Src-Tyrosinkinasefamilie nicht funktionell sind, ist auch die Zytokinsignaltransduktion gestört (Corey et al., 1999). Die Transformation von Fibroblasten durch Src benötigt Stat3 (Turkson et al., 1999). Die Tyrosinkinase Hck der Src-Familie ist z. B. mit dem Interleukin-6-Rezeptoranteil gp130 assoziiert (Ernst et al., 1994), wobei nicht klar ist, ob sich diese Komplexe ligandenabhängig oder unabhängig bilden (Corey et al., 1999). Noch gibt es daher kein eindeutiges Modell für die Funktion der Src-Tyrosinkinasen in der Zytokin-signaltransduktion (Corey et al., 1999). Es ist jedoch bekannt, daß Src-Kinasen einerseits den Transkriptionsfaktor c-Myc induzieren können, andererseits über das Adapterprotein Grb2 den MAP-Kinase Weg stimulieren können (siehe 1.2).

Die bisher bekannten Zielgene der Interleukin-6-Zytokine, die durch Stat1 bzw. Stat3 aktiviert werden, können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die erste Gruppe umfaßt die APP Gene (acute phase proteins), wie z. B. c-reaktives Protein, α_1 -Antichymotrypsin, α_2 -Macroglobulin, lipopolysaccharide-bindendes Protein, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases). Die zweite Gruppe sind Transkriptionsfaktoren JunB und c-Fos, IRF-1 (interferon regulatory factor) und C/EBP (CCAAT enhancer binding protein). Außerhalb dieser Gruppen werden noch weitere Zielgene aktiviert u. a. auch gp130 (Heinrich et al., 1998). Die Bindestellen der STAT-Proteine in den von ihnen aktivierten Promotoren liegt häufig mehrfach nebeneinander, so daß man sich vorstellen kann, daß STAT-Proteine auf der DNA als Multimere vorliegen. Darüberhinaus findet man die Bindesequenz von STAT-Proteinen häufig neben den Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren und es ist anzunehmen, daß STAT-Proteine bei der Transaktivierung der Promotoren mit weiteren Transkriptionsfaktoren kooperieren (Heinrich et al., 1998, Schaefer et al., 1995, Look et al., 1995).

In 1.3 wurde erläutert, daß fehlregulierte Komponenten von Signaltransduktionswegen auch als Onkogene wirken können. Für einige Zytokinrezeptoren sind Mutationen beschrieben worden, die zu einer onkogenen Aktivierung führen. Das v-mpl Onkogen

(siehe auch Abb. 3) wird vom Genom des murine myeloproliferative leukemia virus (MPLV) kodiert. Das v-mpl Protein (284 Aminosäuren) entstand aus einer Fusion des Friend-murine leukemia virus (F-MuLV) env-Protein (Aminosäuren 1-100) mit dem c-mpl Gen, welches dem Thrombopoetinrezeptorgen entspricht (Aminosäuren 101-284). Dieses chimäre Protein wirkt vermutlich als konstitutiv aktiver Rezeptor und führt in virus-infizierten Mäusen zu wachstumsfaktor-unabhängigen Kolonien myeloiden, erythroiden und megakaryozytischen Ursprung (Abb. 3, Gonda et al., 1997). In der α -Kette des humanen GM-CSF/IL-3/IL-5 Rezeptors hat man Mutationen gefunden, die zu einer konstitutiv aktiven Form führen. Ebenso wie diese spielen autosomal dominante Mutationen im humanen Erythropoetinrezeptor möglicherweise eine Rolle in primären Polycythämien. In der Maus sind einige Erythropoetin-rezeptormutationen beschrieben, die zu Erythroleukämien führen können (Gonda et al., 1997). Für die JAKs sind zwei Fusionsproteine Tel-Jak3 beschrieben worden, die aus humanen Leukämiezellen isoliert werden konnten (Aringer et al., 1999). Diese Fusionsproteine können über ihren Tel-Anteil dimerisieren und so die Kinase konstitutiv aktivieren (Corey et al., 1999). Außer für verschiedene Zytokinrezeptoren und JAKs ist auch für Stat3 gezeigt worden, daß es in vielen humanen Tumoren permanent aktiviert ist und als konstitutiv aktive Mutante in Experimenten mit Mäusen als Onkogen wirkt (Bromberg et al., 1999). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Zytokinrezeptoren und der von ihnen ausgehenden Signalwege bei der Tumorentstehung und Tumorprogression im hämatopoetischen System.

1.5 Gfi-1 als neu entdecktes Proto-Onkogen in murinen T-Zelltumoren

Für das Verständnis der Tumorentstehung ist es notwendig, die beteiligten Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierzu bietet sich ein breites Spektrum von Methoden an. In 1.2 wurde schon auf die Bedeutung von Retroviren und DNA-Viren für die Entdeckung von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen hingewiesen (Lanfranccone et al., 1994). Als weiterer potenter Ansatz hat sich die Verwendung von transgenen Mausmodellen zur Klärung der Kooperation zwischen Onkogenen herausgestellt (van Lohuizen et al., 1990). Durch die Infektion von mehrfach transgenen Mäusen mit Retroviren (MoMuLV) kann es nach Integration des Provirus im genomischen Locus eines Proto-Onkogens zu dessen Aktivierung kommen. Diese Insertionsmutagenese kann die Tumorentstehung beschleunigen, wenn das Proto-Onkogen mit den als Transgen

exprimierten Onkogenen kooperiert. Durch anschließende Isolierung der Integrationsstellen aus den so entstandenen Tumoren können somit neue Proto-Onkogene identifiziert werden (Möröy et al., 1999). Die Infektion von doppeltransgenen Mäusen (Pim-1/L-myc) mit MoMuLV und die anschließende Klonierung der Integrationsstellen des Provirus innerhalb des Genoms der Tumoren, hat dabei u. a. zur Identifikation des neuen murinen Proto-Onkogens Gfi-1 (growth factor independence) geführt (Zörnig et al., 1996, Schmidt et al., 1996). Der Name Gfi-1 leitet sich von dem Rattenhomologen ab, das die Fähigkeit hat, eine Ratten T-Zelllymphomlinie IL-2 unabhängig wachsen zu lassen (Abb. 5, Gilks et al., 1993). Das Gfi-1 der Ratte wurde bereits vorher in einem vergleichbaren genetischen Selektionsprozeß gefunden, bei dem zunächst die Interleukin-2 abhängige Rattenzelllinie durch Infektion mit dem Retrovirus einer Insertionsmutagenese ausgesetzt worden war und dann auf Interleukin 2 Unabhängigkeit selektioniert wurde. In mehreren so gewonnenen Zellklonen wurde als Provirusintegrations-stelle der Gfi-Locus identifiziert (Gilks et al., 1993). Gfi-1 wird in Thymozyten, Hoden und in geringerem Maße im Knochenmark, sowie nach Aktivierung in peripheren T-Zellen exprimiert. Eine Analyse der Proteinstruktur ergab, daß Gfi-1 im c-terminalen Bereich 6 Zinkfinger vom Typ C2-H2 hat (zur Funktion von Zinkfingern siehe Mackay et al., 1998). Über ein *in-vitro* Verfahren konnte gezeigt werden, daß drei dieser Zinkfinger sequenzspezifisch an DNA binden können. Das Protein ist im Zellkern lokalisiert und wirkt in Experimenten mit synthetischen Promotoren, die Gfi-1 Bindestellen enthalten, als transkriptioneller Repressor (Zweidler-McKay et al., 1996, Grimes et al., 1996). Die n-terminalen ersten 20 Aminosäuren von Gfi-1 sind innerhalb einiger transkriptioneller Repressoren, die ebenfalls DNA-bindende Zinkfinger besitzen konserviert. Diese Domäne wird daher entsprechend aller sie besitzenden Proteine auch als SNAG-Domäne (snail/slug gfi-1) bezeichnet (Abb. 5, Grimes et al., 1996). Inzwischen ist noch ein weiteres murines Gfi-1 Homolog entdeckt worden, welches Gfi-1B genannt wurde (Grimes et al., 1996). Gfi-1B zeigt eine ähnliche gewebespezifische Expression wie Gfi-1 und kann dieselbe DNA-Sequenz binden. Von Gfi-1B sind sowohl das humane als auch das Huhn-Homolog charakterisiert worden (Abb. 5, Roedel et al., 1999, Fuchs et al., 1997). Weitere Experimente mit Gfi-1 transgenen Mauslinien konnten die onkogenen Eigenschaften von Gfi-1 bestätigen (Schmidt et al., 1998a) und gaben erste Hinweise auf die physiologische Funktion von Gfi-1 bei der T-Zellreifung im Thymus (Schmidt et al., 1998b). In beiden Fällen ist eine synergistische Wirkung mit der Serin/Threoninkinase Pim-1 beobachtet worden. Bis heute ist es jedoch nicht möglich die physiologische und pathophysiologische Funktion von Gfi-1 einem

bekannten Signaltransduktionsweg zuzuordnen. Gfi-1 scheint jedoch für ein Interleukin 2 unabhängiges Wachstum von peripheren T-Zellen wichtig zu sein (Gilks et al., 1995, Zörnig et al., 1996). Es sind zwar für Gfi-1 und Gfi-1B mögliche Zielgene publiziert worden (Grimes et al., 1996, Tong et al., 1998), eine wesentliche Rolle dieser Zielgene bei der Gfi-1 induzierten Lymphomagenese oder der Gfi-1 abhängigen T-Zellreifung konnte jedoch nicht gefunden werden (Schmidt et al., 1998a, Schmidt et al., 1998b).

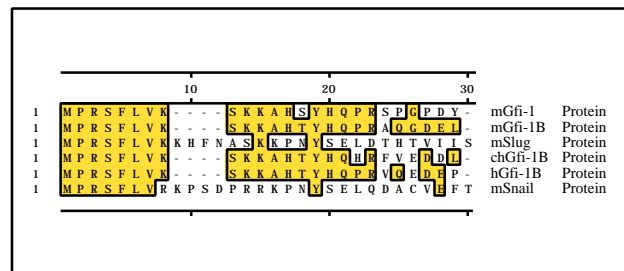


Abb. 5 Die Gfi Familie der transkriptionellen Repressoren

Sequenzvergleich des n-Terminus nach Jotun-Hein. Identische Bereiche sind grau unterlegt. Die Skala entspricht der Position der Aminosäuren der Konsensussequenz. Abkürzungen: ch = chicken (Huhn), h = human, m = murin

1.6 Fragestellung: Funktion von Gfi-1 innerhalb bekannter Signaltransduktionswege ?

Die obigen Ausführungen weisen daraufhin, daß es notwendig ist, Gfi-1 in einen der bekannten Signaltransduktionswege einzuordnen. Als Transkriptionsfaktor kann Gfi-1 grundsätzlich auf zweierlei Arten in der Zelle wirken. Gfi-1 kann selbst transkriptionell aktiviert werden und dann weitere Zielgene regulieren. In diesem Fall wäre es also notwendig, den Gfi-1 Promotor zu isolieren, seine regulatorischen Abschnitte zu charakterisieren, sowie nach weiteren Zielgenen von Gfi-1 zu suchen. Die andere Wirkungsweise von Gfi-1 kann unabhängig von direkten transkriptionellen Ereignissen auf der Interaktion mit zellulären Partnern beruhen. Gfi-1 könnte Signaltransduktionswege über potentielle Interaktionspartner beeinflussen und so seine physiologische oder seine onkogene Wirkung entfalten. Denkbar ist auch eine Kombination aus beiden Szenarien, bei der die transkriptionelle Aktivität von Gfi-1 durch Interaktionspartner gesteuert wird. Um mögliche Interaktionspartner von Gfi-1 zu isolieren bieten sich eine Vielfalt biochemischer und molekularbiologischer Methoden an (Guarente et al., 1993, Allen et al., 1995). Für das weitere Vorgehen wurde ein genetisches Selektionsverfahren in Hefen gewählt, das aufgrund der Verwendung von zwei chimären (oder hybriden) Proteinen auch als „Two-

Hybrid“ Verfahren bezeichnet wird (Fields et al., 1989). Im Rahmen dieser Experimente wurde als Interaktionspartner für Gfi-1 das Pias3 Protein gefunden (siehe 1.4), welches bereits als Inhibitor der Stat3 Signaltransduktion charakterisiert worden war. Es konnte gezeigt werden, daß Gfi-1 *in-vitro* und *in-vivo* an Pias3 bindet, mit Pias3 im Zellkern kolokalisiert und die Stat3 Signaltransduktion im Gegensatz zu Pias3 aktivieren kann.

2. Ergebnisse

2.1 Mutanten des Zinkfingerproteins Gfi-1

Zu Beginn der Arbeit war über die Struktur und Funktion von Gfi-1 wenig bekannt (vergleiche 1.5). Eine Analyse der Proteinsequenz zeigte drei auffällige Abschnitte. Die Aminosäuren 1-20 sind unter mehreren transkriptionellen Repressoren konserviert und wurden daher als SNAG-Domäne bezeichnet (Grimes et al., 1996). Die Aminosäuren 257 bis 455 kodieren für insgesamt 6 Zinkfinger des Typs C2-H2. Daher wurden insgesamt 6 Mutanten des Gfi-1 Proteins über PCR und die Primer Gfi-A bis Gfi-F generiert und sequenziert (Gilks et al., 1993, Abb. 6 oben). Die Mutanten wurden mit den römischen Ziffern I bis VI bezeichnet und als Fusionsproteine mit der DNA-bindenden Domäne des bakteriellen LexA Proteins in Hefen exprimiert (Abb. 6, Rödel, 1995). Ihre Expression im Hefestamm L40 konnte erfolgreich mit einem LexA-Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ihr intrinsisches Transaktivierungspotential war niedrig, denn es konnte nur ein geringes Wachstum der Hefen unter Histidin-selektiven Bedingungen beobachtet werden. Eine Zugabe von 20 mM Aminotriazol zum Medium konnte ein Wachstum aller LexA Gfi-1 Mutanten innerhalb von vier Tagen vollständig unterdrücken. Daher sind alle LexA Gfi-1 Mutanten für einen Einsatz bei einer Interaktionspartnersuche nach dem „Two-Hybrid“ System geeignet.

2.2 Suche nach Gfi-Interaktionspartnern

Nachdem sich alle LexA-Gfi Proteine für eine Interaktionssuche als geeignet herausgestellt hatten, wurde entschieden, das Konstrukt LexA Gfi-I einzusetzen, welches das gesamte Gfi-1 als LexA Fusionsprotein exprimieren kann. Auf diese Weise sollten sowohl Interaktionspartner der Zinkfinger, die nicht alle für DNA-Bindung notwendig sind (vergleiche 1.5), als auch Interaktionspartner des n-terminalen Abschnitts gefunden werden. Die eingesetzte cDNA Bibliothek stammte aus Mausembryonen (Tag 10,5 p. c.). Die cDNA Inserts waren bei ihrer Herstellung auf eine Größe von ca. 350-700 Nukleotide selektioniert worden und liegen als c-terminale Fusionskonstrukte des Transaktivators

VP16 vor. (Hollenberg, persönliche Mitteilung, siehe Material und Methoden). Die Bibliothek wurde insgesamt zweimal amplifiziert.

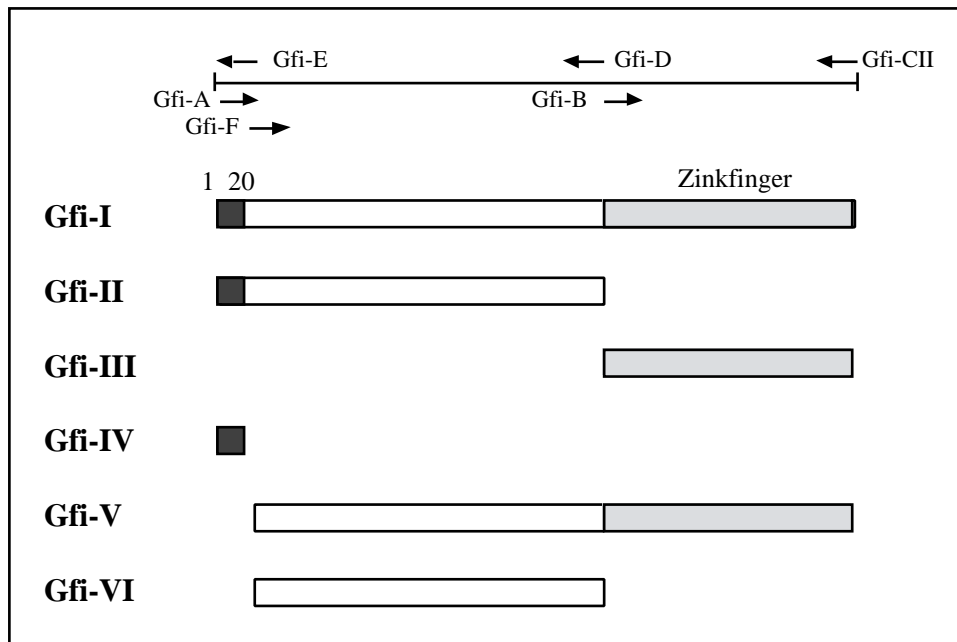


Abb. 6: Die Gfi-1 Mutanten I - VI

Alle PCR Produkte sind c-terminal vom LexA Protein in die BamHI/EcoRI Schnittstellen inseriert und danach sequenziert worden. Die relative Position der verwendeten Primer (siehe Material und Methoden) ist durch Pfeile eingezeichnet.

Die Bibliothekskonstrukte verhalten sich in Hefen als Plasmide mit mehrfacher Kopienzahl (2 μ ORI), kodieren für den auxotrophen Marker Leu2 und die Transkription der VP16-Fusionsproteine wird in Hefe konstitutiv durch den Alkoholdehydrogenase (ADH) Promotor angetrieben (siehe auch Material und Methoden). Die Gesamtkomplexität der embryonalen Genbibliothek liegt bei ca. 1 Million unabhängiger Klone. Insgesamt sind bei der Suche 1,5 Millionen primäre Hefetransformanten in Gegenwart von 20 mM Amino-triazol (vergleiche 2.1) unter Histidin-selektiven Bedingungen ausplattiert worden (Abb. 7 a). Nach vier Tagen wurden die gewachsenen Hefeklone nach dem Schema in Abb. 7 a weiteranalysiert. Zunächst wurden alle Hefeklone unter nicht Histidin-selektiven Bedingungen auf die Aktivität der β -Galaktosidase getestet. Für die Weiterverwendung wurden nach drei bis fünf Tagen nur die β -Galaktosidase positiven Klone (blaue Kolonien) verwendet. Aus diesen Hefen wurde das Bibliotheksplasmid isoliert, in Bakterien vermehrt und das Insert durch Sequenzierung weiter analysiert. Die Sequenzanalyse ergab, daß insgesamt vier Inserts (Ubc9, „Barry“, „Robin“, „Andy“) mehrfach bei der Interaktions-suche gefunden worden waren. Das Insert Ubc9 enthielt fast den gesamten kodierenden Bereich eines bereits bekannten Proteins, alle anderen Inserts konnten bei einem Vergleich

mit einer Sequenzdatenbank zunächst keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden. Die Bibliotheksplasmide, die diese Inserts enthielten, wurden nun erneut mit den LexA Gfi-1 Mutanten im L40 Hefestamm auf Interaktion mit Gfi-1 und seinen Mutanten durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität getestet (Abb. 7 b). Dieses Experiment zeigte, daß alle potentiellen Interaktionspartner hauptsächlich mit dem n-terminalen Anteil von Gfi-1 (= Gfi-II) interagieren. Durch die Interaktionssuche in Hefe konnten also zunächst 4 Genabschnitte von potentiellen Interaktionspartnern isoliert werden. Alle Klone aus der primären Suche, die nur einmal vorhanden waren, wurden nicht weiter analysiert.

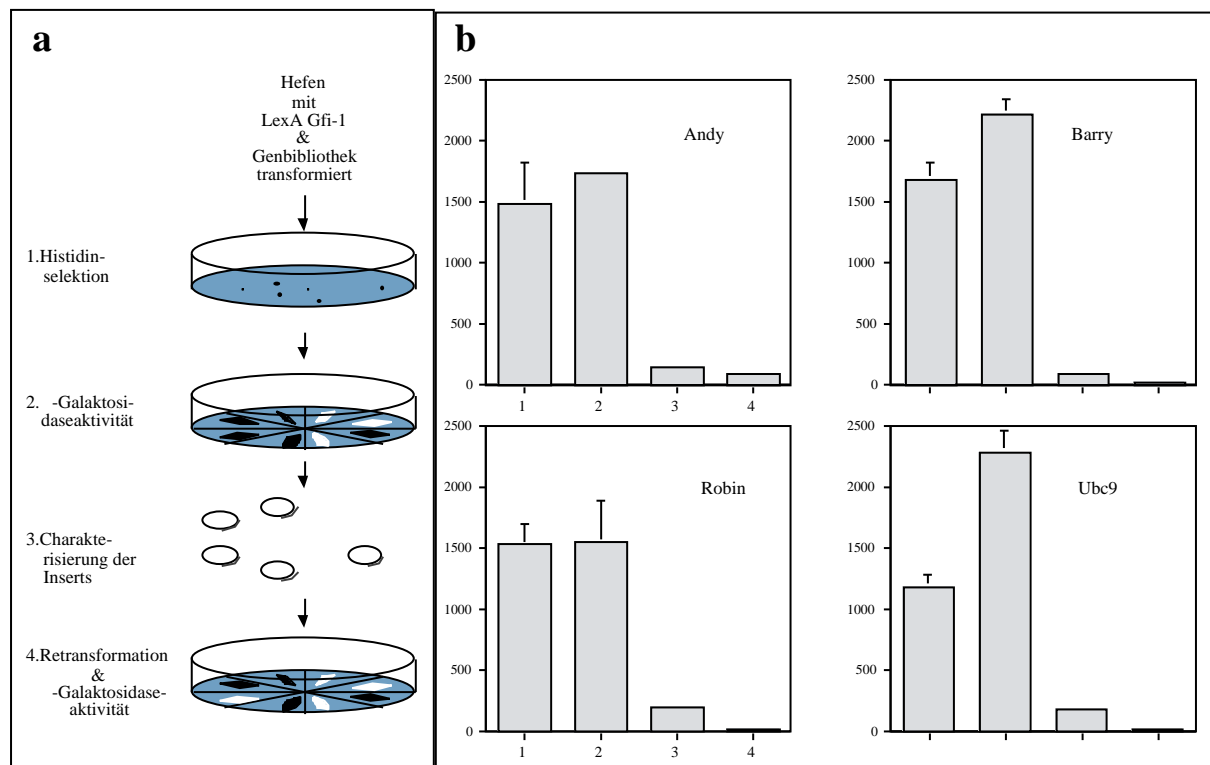


Abb. 7: Selektionsschema der Interaktionssuche und Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der vier ausgewählten Interaktionspartner

a) Das Vorgehen bei der Interaktionssuche ist schematisch von oben nach unten dargestellt. Nach Ausplattieren der mit der Genbibliothek transformierten Hefen wurden folgende experimentellen Einzelschritte durchgeführt: Schritt 1: Isolierung der Klone, die die Histidinselektion überstehen. Schritt 2: Bestimmung der Klone, die zusätzlich β -Galaktosidaseaktivität zeigen. Schritt 3: Charakterisierung und Sequenzierung der Bibliotheksplasmide. Schritt 4: Erneuter Test der Interaktionskandidaten auf β -Galaktosidaseaktivität in Hefe

b) Ergebnis der β -Galaktosidaseaktivität der vier Interaktionskandidaten „Andy“, „Barry“, „Robin“, Ubc9. Y-Achse: relative β -Galaktosidaseaktivität, x-Achse: 1) LexA Gfi-I, 2) LexA Gfi-II, 3) LexA Gfi-III, 4) LexA. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus drei einzelnen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung. Die LexA Gfi-1 Konstrukte haben ohne Bibliotheksplasmid in dieser Messung eine vernachlässigbar kleine β -Galaktosidaseaktivität.

Da Gfi-1 in der Maus sehr geweberestriktiv exprimiert wird (vergleiche 1.5), zur Interaktionssuche jedoch eine embryonale Genbibliothek verwendet worden ist, erschien es sinnvoll, zunächst die Expression der potentiellen Interaktionspartner zu überprüfen und dadurch ihren Kreis einzuengen. Bei einer Analyse der RNA-Expression stellte sich heraus, daß die Partner „Andy“ und „Robin“ ausschließlich im Hoden exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Da das Hauptinteresse der Arbeitsgruppe aber die Onkogenese im lymphatischen System ist, wurde von einer weiteren Analyse dieser potentiellen Interaktionspartner abgesehen. Die Ubc9 mRNA wird ubiquitär exprimiert (Daten nicht gezeigt), von einer Analyse der möglichen Gfi-1-Ubc9 Interaktion wurde aber abgesehen, weil Ubc9 in sehr vielen Interaktionsstudien in Hefe gefunden wurde und vermutlich ein häufig vorkommender falsch positiver Kandidat ist (siehe auch 3.1.2.2). Der Interaktionspartner „Barry“ ist ebenfalls ubiquitär exprimiert (vergleiche 2.4). Da es sich bei „Barry“ um ein unbekanntes Gen handelte, wurde dieser Interaktionspartner weiter analysiert.

2.3 Identifizierung von „Barry“ als Teil der volllängen cDNA von Pias3

Eine erneute Datenbankabfrage zu einem späteren Zeitpunkt ergab dann, daß die Sequenz von „Barry“ mit dem c-terminalen Bereich des Proteins Pias3 (Chung et al., 1997, siehe auch 1.4) identisch ist. Die Übereinstimmung erstreckt sich über den gesamten Bereich des Inserts aus der embryonalen Genbibliothek (Abb. 8 a) und der Leserahmen, der durch den VP16-Anteil n-terminal des Inserts vorgegeben war, ist mit dem des Pias3 Proteins identisch. Folglich entspricht der in der Interaktionssuche isolierte Hefeklon „Barry“ dem c-Terminus von Pias3.

Um die vollständige Pias3 cDNA zu erhalten, wurde eine embryonale murine cDNA Bank mit dem „Barry-Insert“ als Probe abgesucht. Es konnte nur ein weiteres Fragment der Pias3 cDNA isoliert werden, daß nicht den vollständigen publizierten 5' Bereich enthielt. Die isolierte cDNA bestand darüberhinaus aus Bereichen, die offensichtlich nicht zum Pias3 Gen gehörten (Daten nicht gezeigt). Sie wurde daher in weiteren Experimenten nicht mehr verwendet. Als Alternative wurde versucht das 5' Ende von Pias3 über RACE-PCR zu isolieren (Primer siehe Abb. 8 a, RACE-PCR vergleiche Material und Methoden). Es konnten mehrere 5' Enden von Pias3 isoliert werden, die jedoch alle im 5' Bereich eine

von der publizierten Sequenz abweichende DNA-Sequenz aufwiesen. Vermutlich stellen sie eine Spleißvariante der zuerst publizierten Pias3 Sequenz dar (Abb. 8 a). Für das mit Pias3 verwandte Protein Pias1 sind solche Spleißvarianten im 3' Bereich der kodierenden Sequenz schon beschrieben worden (Liu et al., 1998). Daher ist für alle folgenden Experimente die publizierte cDNA von Pias3 verwendet worden, die von K. Shuai, Los Angeles USA, zur Verfügung gestellt worden ist (Chung et al., 1997).

2.4 Strukturelle Analyse von Pias3 und von möglichen homologen Proteinen

Das Pias3 Protein hat eine Länge von 583 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 68 kDa. Eine Analyse der Proteinsequenz ergab die Anwesenheit eines Zinkfingermotivs vom Typ C2-C2 bzw. H2-C2 (Chung et al., 1997, Wu et al., 1997, Abb. 8 b). Weiterhin fand sich weiter c-terminal eine Abfolge saurer Aminosäuren (Liu et al., 1998). Ein Absuchen der PROSITE Datenbank nach potentiellen Phosphorylierungsstellen lieferte eine mögliche PKA Phosphorylierungsstelle und mehrere Casein Kinase II und PKC Phosphorylierungsstellen. Ein Vergleich der Proteinsequenz zwischen Pias3 und Pias1 zeigte, daß in besonders hohem Maße der n-Terminus (As 1-68) zwischen den beiden Proteinen konserviert ist (in Abb. 8 b nicht gezeigt). Eine weitere hochkonservierte Region fand sich zwischen As 78-373 (Pias3) bzw. As 121-417 (Pias1). Diese Region umfaßt den potentiellen Zinkfinger (Abb. 8 b). Eine Datenbanksuche mit diesem Sequenzabschnitt führte zur Entdeckung einiger Proteine, die einen homologen Bereich enthalten (Abb. 8 b). Interessanterweise ist der potentielle Zinkfinger zwischen allen Vertretern konserviert. Das Gu BP (Gu-Binding Protein) ist vermutlich das humane Homolog zu Pias1 (Liu et al., 1998). Es wurde durch eine Interaktionspartnersuche in Hefe als Interaktionspartner des Gu-Proteins identifiziert (Valdez et al., 1997). Das Gu-Protein war als humanes nukleäres Autoantigen gefunden worden und ist identisch mit RNA-Helikase II (Valdez et al., 1997). Miz1 (mMsx interacting zinc finder) ist durch dasselbe Verfahren als Interaktionspartner des Homeoboxgenes Msx2 identifiziert worden (Wu et al., 1997). hDEAD/H binding protein ist wahrscheinlich eine Spleißvariante von Pias1 (Liu et al., 1998). rKChAP (K⁺ channel-associated protein) ist ebenfalls im „Two-Hybrid“ System als Interaktionspartner eines spannungsgesteuerten Kaliumionenkanals identifiziert worden, das die Expression des Ionenkanalproteins vermutlich durch direkte Interaktion steuert (Wible et al., 1998). rARIP3 (rat androgen receptor interacting protein 3) ist als Interaktionspartner des

2. Ergebnisse

Androgenrezeptors gefunden worden, der die Funktion eines transkriptionellen Koregulators hat (Moilanen et al., 1998).

In Abb. 8 c sind die Ergebnisse der Sequenzanalyse in Form eines phylogenetischen Stammbaumes zusammengefaßt. Nach dieser Analyse lassen sich drei Gruppen unterscheiden. Gruppe 1 sind das hDEAD/H binding protein, hGu BP (hPias1) und mPias1. Gruppe 2 bilden rARIP3 und Miz1 und Gruppe 3 bilden mPias3 und rKChAP.

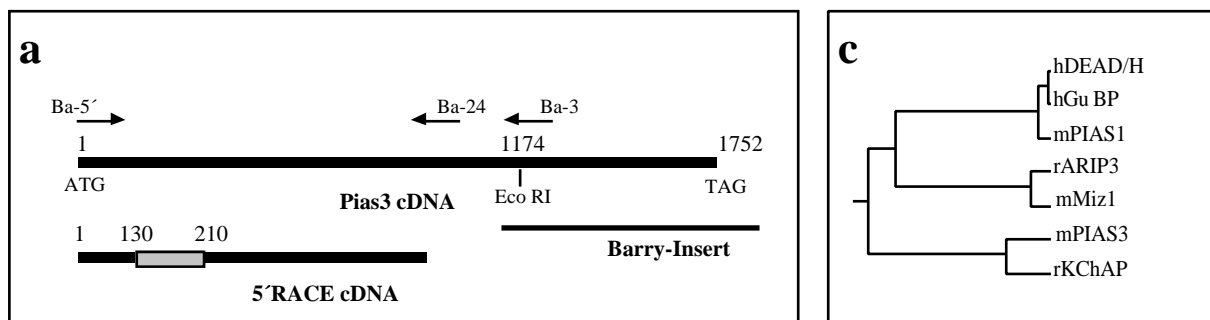


Abb. 8: Sequenzvergleich zwischen „Barry“ und der Pias Proteinfamilie

a) Schema der Position des „Barry-Inserts“, der verwendeten Primer und des 5' RACE-PCR Klons innerhalb der Pias3 cDNA. Der nicht mit der publizierten Pias3 Sequenz identische Teil des 5' RACE-PCR Klons ist durch einen Kasten gekennzeichnet.

b) (nächste Seite) Sequenzvergleich der Proteine hDEAD, hGu BP, mPias1, rARIP3, Miz1, mPias3, rKChAP nach Jotun Hein. Homologe Bereiche sind grau unterlegt. Die zwei schwarzen Kästen kennzeichnen den potentiellen Zinkfinger. Die Position der Aminosäuren ist von den jeweiligen Proteinen abgeleitet.

c) Phylogenetischer Stammbaum der PIAS Proteinfamilie. Die Länge der Äste ist ein Maßstab für den Verwandtschaftsgrad.

b

111	V	S	L	L	G	P	K	H	K	L	E	L	P	H	L	T	S	A	L	H	P	V	H	P	D	I	K	L	Q	K	L	P	F	Y	D	L	L	D	E	L	hDEAD/H
105	V	S	L	L	G	P	K	H	E	L	E	L	P	H	L	T	S	A	L	H	P	V	H	P	D	I	K	L	Q	K	L	P	F	Y	D	L	L	D	E	L	hGu BP
111	V	S	L	L	G	P	K	H	E	L	E	L	P	H	L	T	S	A	L	H	P	V	H	P	D	I	K	L	Q	K	L	P	F	Y	D	L	L	D	E	L	mPIAS1
121	V	L	L	Q	D	T	K	P	T	F	E	M	Q	Q	P	S	P	P	I	P	P	V	H	P	D	V	Q	L	K	T	L	P	F	Y	D	V	L	D	V	L	rARIP3
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	Q	P	S	P	P	I	P	P	V	H	P	D	V	Q	L	K	N	L	P	F	Y	D	V	L	D	V	L	mMiz1	
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	V	H	P	D	V	T	M	K	P	L	P	F	Y	E	V	Y	G	E	L	mPIAS3	
50	G	T	L	L	G	P	K	R	E	V	D	M	H	P	P	L	P	-	-	Q	P	V	H	P	D	V	T	M	K	P	L	P	F	Y	E	V	Y	G	E	L	rKChAP
151	I	K	P	T	S	L	A	S	D	N	S	Q	R	F	R	E	T	C	F	A	F	A	L	T	P	Q	Q	V	Q	I	S	S	S	M	D	-	I	S	G		
145	I	K	P	T	S	L	A	S	D	N	S	Q	R	F	R	E	T	C	F	A	F	A	L	T	P	Q	Q	V	Q	I	S	S	S	M	D	-	I	S	G		
151	I	K	P	T	S	L	A	S	D	N	S	Q	R	F	R	E	T	C	F	A	F	A	L	T	P	Q	Q	V	Q	I	S	S	S	M	D	-	I	S	G		
161	I	K	P	T	S	L	V	Q	S	S	I	Q	R	F	Q	E	K	F	F	I	F	A	L	T	P	Q	Q	V	R	E	I	C	I	S	R	D	F	L	P	G	
30	I	K	P	T	S	L	V	Q	S	S	I	Q	R	F	Q	E	K	F	F	I	F	A	L	T	P	Q	Q	V	R	E	I	C	I	S	R	D	F	L	P	G	
98	I	R	P	T	T	L	A	S	T	S	S	Q	R	F	E	E	A	H	F	T	F	A	L	T	P	Q	Q	L	Q	I	L	T	S	R	E	V	L	P	G		
88	I	R	P	T	T	L	A	S	T	S	S	Q	R	F	E	E	A	H	F	T	F	A	L	T	P	Q	Q	L	Q	I	L	T	S	R	E	V	L	P	G		
190	T	K	C	D	F	T	V	Q	V	Q	L	R	F	C	L	S	E	T	S	C	P	Q	E	D	H	F	P	P	N	L	C	V	K	V	N	T	K	P	C	S	
184	T	K	C	D	F	T	V	Q	V	Q	L	R	F	C	L	S	E	T	S	C	P	Q	E	D	H	F	P	P	N	L	C	V	K	V	N	T	K	P	C	S	
190	T	K	C	D	F	T	V	Q	V	Q	L	R	F	C	L	S	E	T	S	C	P	Q	E	D	H	F	P	P	N	L	C	V	K	V	N	T	K	P	C	S	
201	G	R	R	D	Y	T	V	Q	V	Q	L	R	L	C	L	A	E	T	S	C	P	Q	E	D	N	Y	P	N	S	L	C	I	K	V	N	G	K	L	F	P	
70	G	R	R	D	Y	T	V	Q	V	Q	L	R	L	C	L	A	E	T	S	C	P	Q	E	D	N	Y	P	N	S	L	C	I	K	V	N	G	K	L	F	P	
138	A	K	C	D	Y	T	I	Q	V	Q	L	R	F	C	L	C	E	T	S	C	P	Q	E	D	Y	F	P	P	N	L	F	V	K	V	N	G	K	L	C	P	
128	A	K	C	D	Y	T	I	Q	V	Q	L	R	F	C	L	C	E	T	S	C	P	Q	E	D	Y	F	P	P	N	L	F	V	K	V	N	G	K	L	C	P	
230	L	P	G	Y	L	P	P	T	K	N	G	V	E	P	K	R	P	S	R	P	I	N	I	T	S	L	V	R	L	S	T	-	-	-	T	V	P	N	T		
224	L	P	G	Y	L	P	P	T	K	N	G	V	E	P	K	R	P	S	R	P	I	N	I	T	S	L	V	R	L	S	T	-	-	-	T	V	P	N	T		
230	L	P	G	Y	L	P	P	T	K	N	G	V	E	P	K	R	P	S	R	P	I	N	I	T	S	L	V	R	L	S	T	-	-	-	T	V	P	N	T		
241	L	P	G	Y	A	P	P	P	K	N	G	I	E	Q	K	R	P	G	R	P	L	N	I	T	S	L	V	R	L	S	S	-	-	-	A	V	P	N	Q		
110	L	P	G	Y	A	P	P	P	K	N	G	I	E	Q	K	R	P	G	R	P	L	N	I	T	S	L	V	R	L	S	S	-	-	-	A	V	P	N	Q		
178	L	P	G	Y	L	P	P	T	K	N	G	A	E	P	R	G	P	A	-	-	V	R	S	T	S	H	P	W	L	D	S	Q	P	L	S	P	T	P	S	L	
168	L	P	G	Y	L	P	P	T	K	N	G	A	E	P	K	R	P	S	R	P	I	N	I	T	P	L	A	R	L	S	A	-	-	-	T	V	P	N	T		
266	M	C	-	S	W	T	A	E	I	G	R	N	Y	S	M	A	V	Y	L	V	K	Q	L	S	S	T	V	L	L	Q	R	L	R	A	K	G	I	R	N	P	
260	I	V	V	S	W	T	A	E	I	G	R	N	Y	S	M	A	V	Y	L	V	K	Q	L	S	S	T	V	L	L	Q	R	L	R	A	K	G	I	R	N	P	
266	I	V	V	S	W	T	A	E	I	G	R	N	Y	S	M	A	V	Y	L	V	K	Q	L	S	S	T	V	L	L	Q	R	L	R	A	K	G	I	R	N	P	
277	I	S	I	S	W	A	S	E	I	G	K	N	Y	S	M	S	V	Y	L	V	R	Q	L	T	S	A	M	L	L	Q	R	L	K	M	K	G	I	R	N	P	
146	I	S	I	S	W	A	S	E	I	G	K	N	Y	S	M	S	V	Y	L	V	R	Q	L	T	S	A	M	L	L	Q	R	L	K	M	K	G	I	R	N	P	
216	L	I	G	H	L	S	L	D	-	-	G	I	T	P	C	P	C	L	V	R	Q	L	T	A	G	T	L	L	Q	K	L	R	A	K	G	I	R	N	P		
204	I	V	V	N	W	S	S	E	F	G	R	N	Y	S	L	S	V	Y	L	V	R	Q	L	T	A	G	T	L	L	Q	K	L	R	A	K	G	I	R	N	P	
305	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	I	A	T	T	S	L	R	V	S	L	L	C	P	L	G	K	M	R	L	T	I	P	
300	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	I	A	T	T	S	L	R	V	S	L	L	C	P	L	G	K	M	R	L	T	I	P	
306	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	I	A	T	T	S	L	R	V	S	L	L	C	P	L	G	K	M	R	L	T	I	P	
317	D	H	S	K	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	I	A	T	T	S	L	R	V	S	L	M	C	P	L	G	K	M	R	L	T	I	P	
186	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	I	A	T	T	S	L	R	V	S	L	M	C	P	L	G	K	M	R	L	T	I	P	
253	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	V	A	T	T	S	L	P	G	V	T	H	V	P	A	R	K	M	R	L	T	V	P	
244	D	H	S	R	A	L	I	K	E	K	L	T	A	D	P	D	S	E	V	A	T	T	S	L	R	V	S	L	M	C	P	L	G	K	M	R	L	T	V	P	
345	C	R	A	L	T	C	S	H	L	Q	C	F	D	A	T	L	Y	I	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	V	C	P	V	C	D	K	K	A	P	Y	E	H	
340	C	R	A	L	T	C	S	H	L	Q	C	F	D	A	T	L	Y	I	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	V	C	P	V	C	D	K	K	A	P	Y	E	H	
346	C	R	A	L	T	C	S	H	L	Q	C	F	D	A	T	L	Y	I	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	V	C	P	V	C	D	K	K	A	P	Y	E	H	
357	C	R	A	V	T	C	T	H	L	Q	C	F	D	A	A	L	Y	L	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	I	C	P	V	C	D	K	K	A	A	Y	E	S	
226	C	R	A	V	T	C	T	H	L	Q	C	F	D	A	A	L	Y	L	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	I	C	P	V	C	D	K	K	A	A	Y	E	S	
293	C	R	A	L	T	C	A	H	L	Q	S	F	D	A	A	L	Y	L	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	T	C	P	V	C	D	K	K	A	P	Y	E	S	
284	C	R	A	L	T	C	A	H	L	Q	S	F	D	A	A	L	Y	L	Q	M	N	E	K	K	P	T	W	T	C	P	V	C	D	K	K	A	P	Y	E	S	
385	L	I	I	D	G	L	F	M	E	I	L	K	Y	C	T	D	C	D	E	I	O	F	K	E	D	G	T	W	A	P	M	R	S	K	K	E	V	Q	E	V	
380	L	I	I	D	G	L	F	M	E	I	L	K	Y	C	T	D	C	D	E	I	O	F	K	E	D	G	T	W	A	P	M	R	S	K	K	E	V	Q	E	V	
386	L	I	I	D	G	L	F	M	E	I	L	K	Y	C	T	D	C	D	E	I	O	F	K	E	D	G	S	W	A	P	M	R	S	K	K	E	V	Q	E	V	
397	L	I	L	D	G	L	F	M	E	I	L	N	D	C	S	D	V	D	E	I	K	F	Q	E	D	G	S	W	C	P	M	R	P	K	K	E	A	M	K	V	
266	L	I	L	D	G	L	F	M	E	I	L	N	D	C	S	D	V	D	E	I	K	F	Q	E	D	G	S	W	C	P	M	R	P	K	K	E	A	M	K	V	
333	L	I	I	D	G	L	F	M	E	I	L	N	S	C	S	D	C	D	E	I	O	F	M	E	D	G	S	W	C	P	M	K	P	K	K	E	A	S	E	V	
324	L	I	I	D	G	L	F	M	E	I	L	N	S	C	S	D	C	D	E	I	O	F	M	E	D	G	S	W	C												

2.5 RNA-Expressionsanalyse von Pias3

Eine Analyse der RNA-Expression sollte einerseits klären in welchem Gewebe Pias3 exprimiert wird (vergleiche 2.2), andererseits sollte untersucht werden, ob die Expression von Pias3 einer Regulation unterliegt, wie sie für Gfi-1 bereits gezeigt wurde (Gilks, et al., 1993, Holger Karsunky, persönliche Mitteilung). Für alle Expressionsanalysen wurde das „Barry-Insert“ (vergleiche 2.3) als Probe verwendet. Die Analyse der gewebespezifischen Expression von Pias3 zeigte, daß die cDNA von Pias3 ca. 3,6 kB groß ist und in allen untersuchten Mausgeweben exprimiert wird (Abb. 9 a oberes Bild, vergleiche auch Chung et al, 1997). Zur Kontrolle wurde eine Membran verwendet, die bereits mit einer Gfi-1 Sonde (Zörnig, 1995) und mit GAPDH (Abb. 9 b, unteres Bild) hybridisiert worden war.

Da Gfi-1 in ruhenden T-Zellen kaum exprimiert ist, jedoch durch Aktivierung mit TPA stark induziert werden kann, war von Interesse, ob auch die Pias3 Expression während der T-Zellaktivierung reguliert wird. Abb. 9 b zeigt eine Expressionsanalyse von stimulierten peripheren murinen T-Zellen. Pias3 war ebenso wie Gfi-1 in ruhenden T-Zellen nur schwach exprimiert (Abb. 9 b linkes und rechtes Bild, 0 h). Nach Stimulation mit TPA stieg die Expression von Pias3 während der ersten 30 Minuten bis zu einem Maximum an (Abb. 9 b rechtes Bild, 0,5 h), fiel innerhalb der nächsten zwei Stunden kurz ab (Abb. 9 b rechtes Bild, 3. und, 3 h), um danach noch einmal anzusteigen (Abb. 9 b rechtes Bild, 6 h und 12 h). Die Expression von Gfi-1 stieg in diesem Experiment ab den ersten 30 Minuten an, erreichte nach einer Stunde den Höhepunkt und fiel dann wieder ab (Abb. 9 b rechtes Bild, 0 h – 4 h). Nach 12 Stunden hatte das Gfi-1 Expressionsniveau fast wieder den Ausgangswert erreicht (Abb. 9 b rechtes Bild, 12 h). In einem zweiten Experiment wurde zur Stimulation der murinen peripheren T-Zellen die Kalziumionophore Ionomycin verwendet (Abb. 9 b linkes Bild). Die Expression von Pias3 war lediglich nach 12 Stunden im Vergleich zu den anderen Meßpunkten etwas erhöht (Abb. 9 b linkes Bild, 12 h). Die Expression von Gfi-1 stieg innerhalb einer halben Stunde leicht an veränderte sich danach jedoch nicht mehr (Abb. 9 b linkes Bild, 0,5 h). Im Gegensatz zu einer Stimulation durch TPA war nach Zugabe von Ionomycin sowohl bei der Expression von Pias3 als auch bei der Expression von Gfi-1 kein sprunghafter Anstieg mit einem deutlichem Gipfel zu sehen (Abb. 9 b linkes Bild, 0,5 h – 12 h). Zur Kontrolle der beiden Stimulationsexperimente wurde jeweils die Expression des „immediate-early“ Gens c-fos analysiert, die erwartungsgemäß innerhalb der ersten halben Stunde stark anstieg und danach wieder

abfiel (Abb. 9 b linkes und rechtes Bild, zur Funktion von c-fos siehe Müller et al., 1993). Die Expressionsanalysen nach T-Zellstimulation zeigten, daß sowohl Gfi-1 als auch Pias3 in ruhenden T-Zellen nur schwach exprimiert waren, ihre Expression aber nach Aktivierung durch TPA reguliert wurde. Die Pias3 Expression zeigte dabei zunächst einen ähnlichen Verlauf wie die Expression des „immediate-early“ Gens c-fos und ging der Expression von Gfi-1 zeitlich voraus. Nach 12 Stunden war ein zweiter Anstieg der Pias3 Expression zu sehen. Dieser zweite Anstieg war auch in abgemilderter Form bei der Stimulation durch Ionomycin zu sehen. Diese Experimente wiesen daraufhin, das Pias3 womöglich ähnlich wie Gfi-1 eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielt (Zörnig et al., 1996).

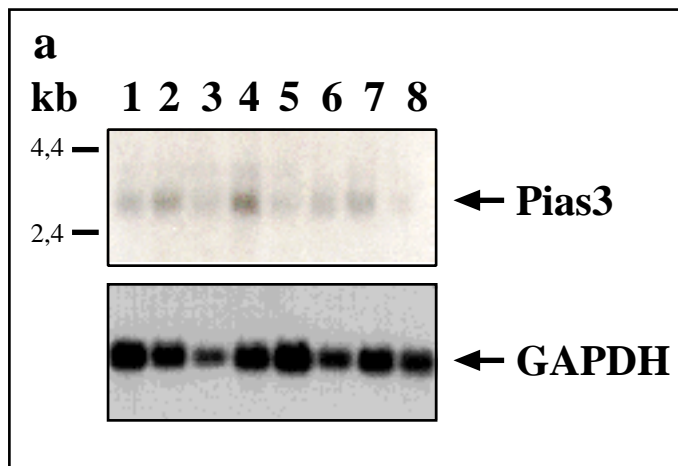
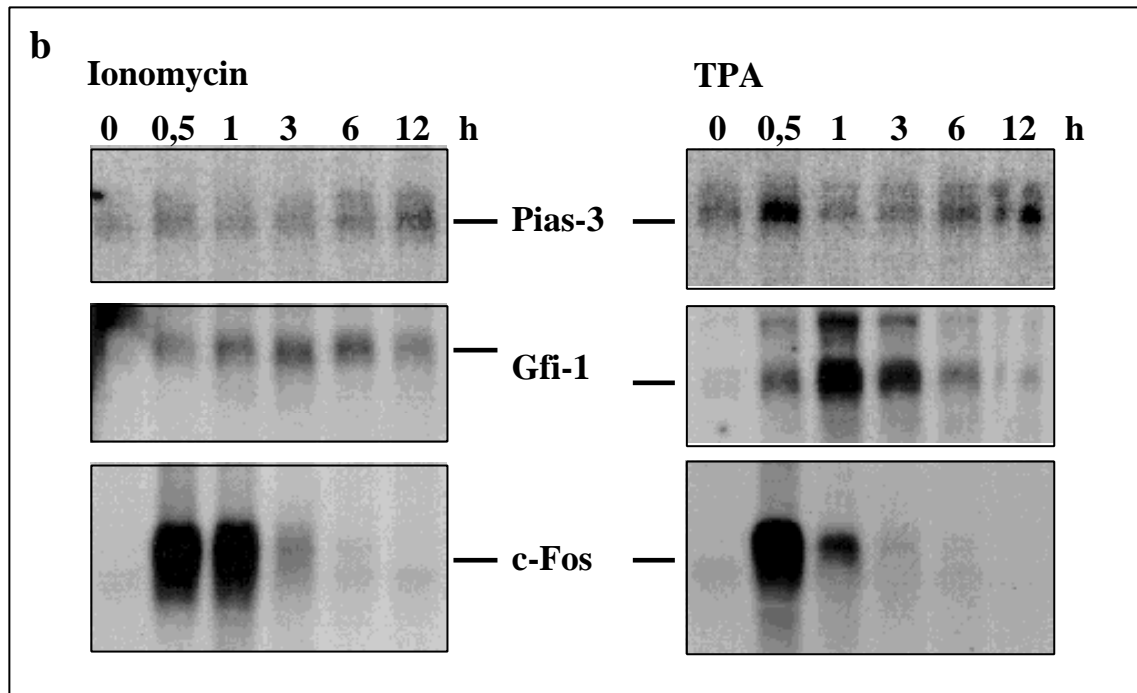


Abb. 9: Expressionsanalyse von Pias3 und Gfi-1

a) Expression von Pias3 in verschiedenen Mausgeweben. Oberes Bild: Expression von Pias3. Unteres Bild: Normalisierung mit GAPDH. Gewebe: 1: Herz, 2: Gehirn, 3: Milz, 4: Lunge, 5: Leber, 6: Skelettmuskel, 7: Niere, 8: Hoden. Aufgetragen sind 2,5 µg Poly A RNA (Clontech).

b) (nächste Seite) Expression von Pias3, Gfi-1 und c-Fos zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation von peripheren murinen T-Zellen mit Ionomycin (links) oder TPA (rechts). Der gleichmäßige Transfer der RNA wurde durch Ethidiumbromidfärbung kontrolliert (siehe Material und Methoden). Aufgetragen sind 10 µg Gesamtzell-RNA



2.6 Kopräzipitation von Gfi-1 und Pias3 *in-vitro* und *in-vivo*

Neben den Interaktionsstudien zwischen Gfi-1 und Pias3 in Hefe (vergleiche 2.2.) wurde die Interaktion der beiden Proteine auch biochemisch durch Kopräzipitationsexperimente untersucht. Zunächst wurde für die Experimente *in-vitro* die Mutante Gfi-II (vergleiche 2.1) als rekombinantes Protein mit „RGS His-Epitop“ in Bakterien exprimiert und nach Aufreinigung renaturiert (siehe Material und Methoden). Für Kontrollzwecke wurde der N-Terminus von Brn3a als zweites Protein mit „RGS His-Epitop“ verwendet (Rödel, 1995, B. Fraß, persönliche Mitteilung). Die Pias3 cDNA wurde in das Plasmid SP64 (Promega) eingefügt und durch *in-vitro* Translation wurde S³⁵-Methionin markiertes Pias3 Protein hergestellt (siehe Material und Methoden). Für den Nachweis einer Assoziation von Gfi-1 und Pias3 *in-vitro* wurden die Proteine in verschiedenen Kombinationen in Puffer vier Stunden bei Raumtemperatur in Gegenwart einer magnetischen NTA-Matrix („NTA-Beads“) inkubiert, über die durch einen Histidin-Nickel-Komplex Proteine mit „RGS His-Epitop“ gebunden und über Magneten aufgereinigt werden können. Nach mehreren Waschschritten wurden die aufgereinigten Proteine durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (siehe Material und Methoden). Als Ergebnis zeigte sich in der Autoradiographie, das Pias3 Protein nur dann aus dem Ansatz aufgereinigt werden konnte, wenn auch das His Gfi-II Protein anwesend war (vergleiche die Spuren 1, 2, 3, Abb. 10 a, oberes Bild). Pias3 Protein konnte weder durch die Anwesenheit des His Brn3a Proteins,

noch durch „NTA-Beads“ alleine aufgereinigt werden (Spuren 2, 3, Abb. 10 a, oberes Bild). Insgesamt wurde ca. ein Drittel des eingesetzten Pias3 Proteins aus dem Ansatz aufgereinigt (vergleiche den Einsatz an Pias3 mit Spur 1, Abb. 10 a, oberes Bild). Eine Färbung des Gels zum Nachweis der eingesetzten rekombinanten Proteine zeigte (vergleiche Material und Methoden), daß gleiche Mengen eingesetzt worden sind (vergleiche die Spuren 1, 2, Abb. 10 a, unteres Bild). Diese Experiment zeigte, daß *in-vitro* unter physiologischen Bedingungen ein Komplex aus dem n-terminalen Proteinabschnitt von Gfi-1 (Mutante Gfi-II) und dem Pias3 Protein nachgewiesen werden kann. Dieser Komplex formte sich nicht mit einem anderen zu Kontrollzwecken eingesetzten rekombinanten Protein (Brn3a).

Für die Untersuchung der Interaktion von Gfi-1 und Pias3 *in-vivo* wurden zwei eukaryontische Expressionsvektoren verwendet, durch die Gfi-I und Gfi-II als „RGS His-Epitop“ Proteine in Zellen mit Hilfe des LTR Promotors (Lovec et al., 1994) exprimiert wurden. His Gfi-I und His Gfi-II wurden über PCR mit den Primern His(K) und Gfi-CII bzw. Gfi-B konstruiert. Pias3 wurde mit einem n-terminal anfusionierten „Flag Epitop“ exprimiert (Chung et al., 1997). Für das Experiment wurden NIH 3T3 Fibroblasten mit einer Kombination aus den oben genannten Plasmiden transfiziert, am nächsten Tag in IP-Lysis Puffer lysiert und dann in IP-Puffer mit „NTA-Beads“ inkubiert (siehe Material und Methoden). Nach Waschen der „NTA-Beads“ wurden die aufgereinigten Komplexe eluiert und zusammen mit den ursprünglichen Zellextrakten durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (Abb. 10 b). Eine Analyse der Zellextrakte auf Expression eines „Flag Epitop“ Proteins zeigte eine starke Bande bei ca. 70 kDa in den Zellen, die mit „Flag Epitop“ Pias3 transfiziert worden sind (Abb. 10 b, oberes Bild, Spuren 2, 4, 5). Die Analyse der präzipitierten Komplexe mit einem Anti-RGS His Antikörper zeigte zwei starke Signale bei ca. 55 kDa (Abb. 10b, mittleres Bild, Spuren 1, 2) und zwei starke Signale bei ca. 45 kDa (Abb. 10 b, mittleres Bild, Spuren 3, 4). Die Signale entsprechen erwartungsgemäß His Gfi-I (Spuren 1, 2) und His Gfi-II (Spuren 3, 4). Beide „RGS His-Epitop“ Proteine sind durch die Bindung an die „NTA-Beads“ präzipitiert worden. Wenn die gleiche Membran mit einem Anti-Flag Antikörper inkubiert wurde, so erkannte man in Spur 2 das Flag Pias3 Signal sehr deutlich, in Spur 4 gar nicht. Ohne ein „RGS His-Epitop“ Protein war bei dieser Expositionsdauer in Spur 5 kein Flag Pias3 zu sehen (Abb. 10 b, mittleres Bild, vergleiche Spuren 2, 4 mit Spur 5). Bei einer Exposition bis zum Ende der Nachweisreaktion (siehe Material und Methoden) wurde auch in den Spuren 4 und 5 ein

Signal detektiert (nicht gezeigt). Möglicherweise handelte es sich dabei um geringe Mengen an Flag Pias3 Protein. Allerdings fanden sich dann auch in Spur 1 und Spur 3 Signale auf dieser Höhe, obwohl in den Zellextrakten kein Flag Pias3 exprimiert wurde. Vielleicht wurden die Signale nach sehr langer Exposition durch eine unspezifische Bindung von zellulären Proteinen an die „NTA-Beads“ bzw. eine unspezifische Reaktion des Anti-Flag Antikörpers verursacht. Die Spezifität der jeweiligen Antigen-Antikörper Reaktion wurde durch eine entsprechende positive Kontrolle auf der Membran überprüft (nicht gezeigt). Das Flag Pias3 Protein konnte also in einem Komplex mit dem His Gfi-I und nicht in einem Komplex mit His Gfi-II durch die „NTA-Beads“ über die Bindung der „RGS His-Epitop“ Proteine aus den Zellen aufgereinigt werden (vergleiche Abb. 10 b, mittleres Bild, Spuren 2, 4 und 5).

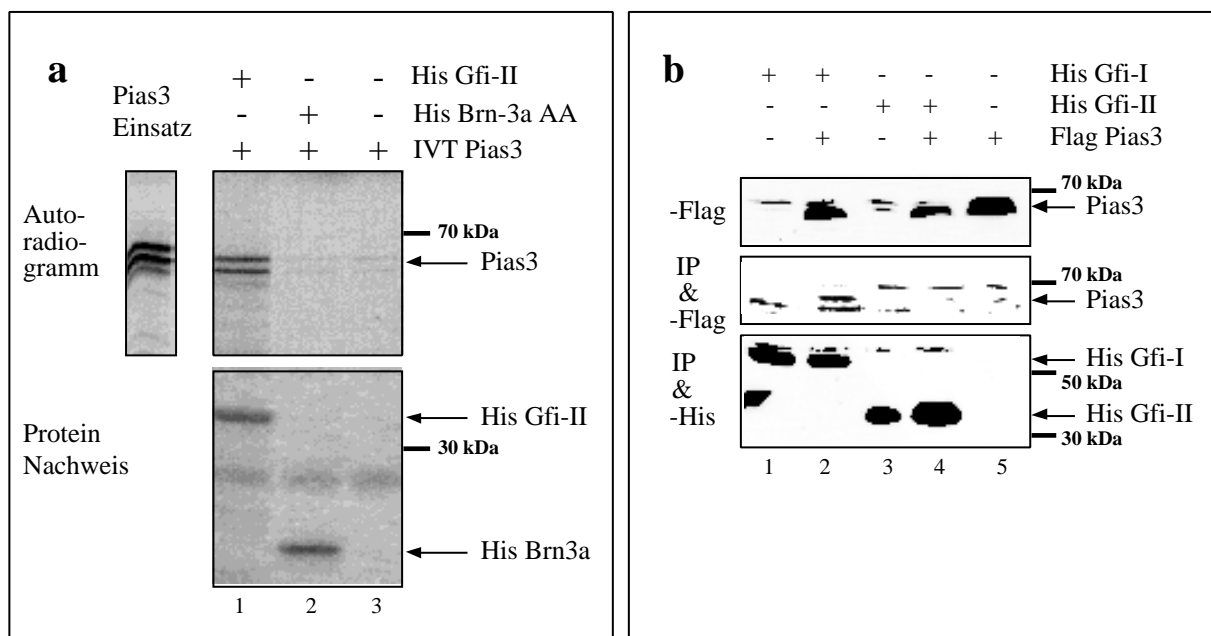


Abb. 10: Kopräzipitation von Pias3 und Gfi-1 *in-vitro* und *in-vivo*

a) Kopräzipitation von *in-vitro* translatierten S³⁵ Methionin markierten Pias3 Protein durch rekombinantes His Gfi-II Protein in NP40-Puffer. Oberes Bild: Autoradiographie, Unteres Bild: Proteinfärbung im Gel. Linke Spur: eingesetztes Pias3 Protein. Spur 1: Pias3 und His Gfi-II, Spur 2: Pias3 und His-Brn3a, Spur 3: nur Pias3.

b) Kopräzipitation von Flag Pias3 und His Gfi-I bzw. His Gfi-II aus Zellextrakten. Oberes Bild: Nachweis des Flag Pias3 Proteins in den Zellextrakten durch den Anti-Flag Antikörper (schwarzer Pfeil), Mittleres Bild: Nachweis des Flag Pias3 Proteins in dem Präzipitat durch den Anti-Flag Antikörper (schwarzer Pfeil), Unteres Bild Nachweis des His Gfi-I bzw. His Gfi-II in dem Präzipitat durch den Anti RGS His Antikörper (schwarzer Pfeil). Spuren: 1: His Gfi-I, 2: His Gfi-I und Flag Pias3, 3: His Gfi-II, 4: His Gfi-II und Flag Pias3, 5: Flag Pias3. Es wurden pro Spur 500 µg Zellextrakt zur Präzipitation eingesetzt. Der Marker (rechts) gibt das relative Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) an. Beide Experimente wurden einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Beide Experimente zeigten, daß Gfi-1 und Pias3 *in-vitro* und *in-vivo* in einem Protein-komplex vorliegen können. *In-vitro* ist dafür der außerhalb des Zinkfingers liegende Anteil von Gfi-1 (Gfi-II) ausreichend. *In-vivo* ist für eine Interaktion das gesamte Gfi-1 Protein notwendig. Die Mutante Gfi-II zeigt *in-vivo* keine Interaktion mit Pias3 (siehe Diskussion).

2.7 Intrazelluläre Lokalisation von PIAS Proteinen, Gfi-1B, Gfi-1 und seinen Mutanten

2.7.1 Gfi-1 , Gfi-1B und Pias3 sind alle in nukleären Punkten im Zellkern lokalisiert

Für den Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen zwei Proteinen ist es notwendig, daß sich beide Proteine wenigstens vorübergehend im selben subzellulären Kompartiment aufhalten. Von Gfi-1 war bereits bekannt, daß es im Zellkern lokalisiert ist (Zweidler-McKay et al., 1996). Von Pias3 gab es hingegen Hinweise, daß es im Zytoplasma lokalisiert sei (Chung et al., 1998, Heinrich et al., 1998), wobei allerdings neuere Publikationen von einer Kernlokalisierung ausgehen (Shuai, 1999). Um die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine nachzuweisen, wurden sie jeweils mit einem GFP-Anteil (green fluorescent protein) c-terminal fusioniert (zur Methode der GFP Proteine vergleiche Chalfie et al., 1994). Somit waren beide Proteine nach Transfektion in NIH 3T3 Zellen durch Immunfluoreszenz mit einem konfokalen LSM Mikroskop (Laser Scanning Mikroscope) nachweisbar (Abb. 11 a). Gfi-1 GFP konnte wie erwartet bei allen untersuchten Zellen im Zellkern detektiert werden (Abb. 11 a). Es lag dort in punktförmigen Strukturen vor, die auch als „nuclear dots“ bezeichnet werden (Lamond et al., 1998). Die Funktion dieser Kernstruktur ist noch nicht bestimmt worden, der Begriff ist rein deskriptiver Natur (vergleiche auch Misteli et al., 1998). Im Gegensatz zu den bisher publizierten Ergebnissen war auch Pias3 fast ausschließlich im Zellkern in ebenfalls punktförmigen Strukturen vorhanden (Abb. 11 b). Nur einige wenige untersuchte Zellen zeigten zusätzlich zu dem punktförmigen Muster im Kern ebenso eine schwache diffuse Färbung im Zytoplasma in der Nähe des Kerns (nicht gezeigt). Möglicherweise hing diese zytoplasmatische Färbung aber auch von einer Überexpression des Pias3 GFP Proteins in der jeweiligen Zelle ab. Da die Expression von Pias3 GFP nicht mit allen Literaturdaten übereinstimmte, wurden in einem zweiten Experiment NIH 3T3 Zellen mit Flag Pias3 transfiziert und das „Flag Epitop“ über indirekte Immunfluoreszenz mit eine Anti-Flag Antikörper nachgewiesen. (Abb. 11 c). Auch beim Nachweis durch indirekte Immun-

fluoreszenz ist das Flag Pias3 Protein in punktförmigen Strukturen im Kern lokalisiert. Die Kontrolle ohne Erstantikörper zeigte keine Färbung (Abb. 11 d). Die verwendete Zelllinie hat keinen Einfluß auf die Proteinlokalisierung, denn in 293 Zellen ist eine ähnliche Lokalisation von Flag Pias3 zu sehen (Daten nicht gezeigt). Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurde mit dem Pias3 Homologen Pias1 und dem Gfi-1 Homologen Gfi-1B ebenfalls jeweils ein GFP Konstrukt hergestellt und unter gleichen Bedingungen in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Beide waren wie ihre Homologen in „nuclear dots“ im Zellkern lokalisiert (Abb. 13 d und Abb.13 e).

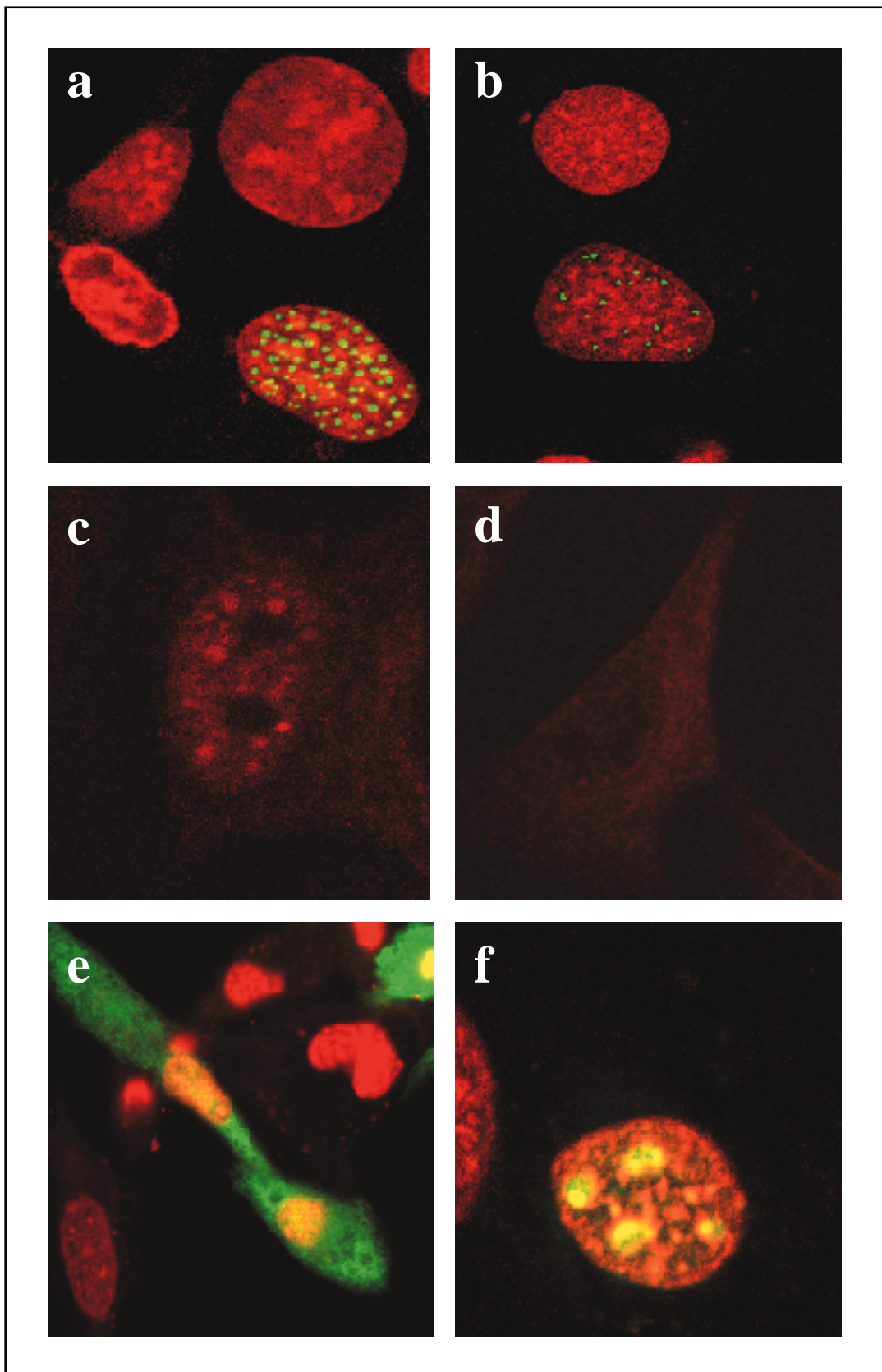
2.7.2 Die Gfi Mutanten Gfi-II und Gfi-III haben eine andere intrazelluläre Lokalisation als Gfi-1

Vom Gfi-1 Protein ist bekannt, daß es ausschließlich im Zellkern vorkommt. Die Kernlokalisierungssequenz ist dabei einerseits der n-terminalen SNAG Domäne zugeordnet worden, andererseits enthalten die 6 Zinkfinger eine zweite Kernlokalisierungssequenz (Grimes et al., 1996). Für die nächsten Experimente wurden die Gfi-1 Mutanten Gfi-II GFP und Gfi-III GFP durch PCR konstruiert (vergleiche 2.1. zur Nomenklatur bzw. für die verwendeten Primer). Während Gfi-II GFP in NIH 3T3 Zellen in der ganzen Zelle vorhanden war und eine diffuse Verteilung zeigte (Abb. 11 e, vergleiche auch Grimes et al., 1996), wurde Gfi-III GFP in NIH 3T3 Zellen nur im Zellkern detektiert (Abb. 11 f). Die Verteilung von Gfi-III GFP zeigte aber ein deutlich anderes Muster im Kern als Gfi-I GFP (vergleiche Abb. 11 und Abb. 11 f). Die Verteilung der Gfi-1 Mutanten in der Zelle stimmt mit den publizierten Daten überein (Grimes et al., 1996), wonach für die korrekte Kernlokalisierung sowohl die n-terminale SNAG Domäne als auch der gesamte Zinkfinger notwendig ist.

Abb. 11 (nächste Seite): Immunfluoreszenzstudien von Pias3, Gfi-1 und seinen Mutanten

NIH 3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, am nächsten Tag fixiert und gefärbt. Das „Flag Tag“ wurde über einen Anti-Flag Antikörper und einen TRITC markierten Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das GFP Protein konnte direkt im FITC Kanal nachgewiesen werden (grün). Die Zellkerne sind durch Propidiumiodid angefärbt worden. Die Bilder sind repräsentative Ausschnitte und wurden zur Anschaulichkeit nachher teilweise eingefärbt.

- a) Gfi-I GFP, b) Pias3 GFP, c) Flag Pias3, d) sekundäre Antikörperkontrolle
e) GFI-II GFP, f) GFI-III GFP



2.8 Kolokalisation von Gfi-1 und Pias3

2.8.1 Gfi-1 GFP und Flag Pias3 sind in den „nuclear dots“ kolokalisiert

Nachdem feststand, daß sowohl Gfi-1 als auch Pias3 in ähnlichen Kernstrukturen lokalisiert sind, wurden nun NIH 3T3 Zellen mit Flag Pias3 und Gfi-I GFP gleichzeitig transfiziert. Das GFP Protein konnte über die Fluoreszenz im FITC Kanal und das „Flag Epitop“ des Pias3 über indirekte Immunfluoreszenz mit einem TRITC markierten Zweitantikörper nachgewiesen werden. Die Trennung der FITC- von den TRITC-Fluoreszenzen war in dem LSM problemlos möglich (Abb. 13 f) und der Antikörperrnachweis des „Flag Epitop“ war spezifisch (vergleiche 2.7.1). Die Aufnahme der doppeltransfizierten Zellen im FITC Kanal zum Nachweis des Gfi-I GFP Proteins zeigte das typische Verteilungsmuster von Gfi-1 (Abb. 12 a grün eingefärbt, vergleiche auch 2.7.1). Die Aufnahme derselben Zelle im TRITC Kanal zum Nachweis des Flag Pias3 zeigte das bekannte Verteilungsmuster des Pias3 Proteins (Abb. 12 b rot eingefärbt, vergleiche auch 2.7.1). Das Übereinanderlegen beider Aufnahmen zeigte, daß die Signale aus dem FITC Kanal fast überall deckungsgleich mit den Signalen aus dem TRITC Kanal waren (Abb. 12 c). Beide Signale waren also in den gleichen Kernstrukturen - oder „nuclear dots“ (Lamond et al., 1998) - vorhanden, was bedeutet, daß Gfi-I GFP und Flag Pias3 im Zellkern kolokalisieren. Eine genauere Betrachtung von Abb. 12 c verdeutlichte, daß in der überwiegenden Mehrheit der angefärbten „nuclear dots“ beide Proteine vorhanden waren (vergleiche auch Abb. 12 a mit Abb. 12 b). Nur in sehr wenigen war ausschließlich ein Signal vorhanden (siehe Abb. 12 c). Das zeigte jedoch auch noch einmal, daß die beiden Fluoreszenzfarben von dem LSM sauber getrennt werden konnten (siehe auch oben).

2.8.2 Gfi-II GFP aber nicht Gfi-III GFP beeinflussen die Kernlokalisation von Flag Pias3

Die biochemischen Daten der Gfi-1 Pias3 Interaktion und die Daten aus den Hefeexperimenten weisen daraufhin, daß für eine Interaktion der Anteil des Gfi-1 Proteins außerhalb der Zinkfinger (Gfi-II) hinreichend und notwendig ist (siehe 2.1, 2.2, 2.6). Daher wurden in einem Ansatz Gfi-II GFP und Flag Pias3 in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Gfi-II GFP war in den doppeltransfizierten Zellen intrazellulär anders verteilt, als in einfach Gfi-II GFP transfizierten Zellen (vergleiche Abb. 12 d mit Abb. 11 e). In allen doppel-

transfizierten Zellen fand sich das Gfi-II GFP Signal (FITC Kanal) im Zytoplasma wieder, häufig in Form von Aggregationen, die direkt von außen an die Kernmembran grenzten (Abb. 12 d). Im Zellkern war kein FITC Signal und somit auch kein Gfi-II GFP detektierbar (Abb. 12 d). Auch der größte Teil des Flag Pias3 Proteins (TRITC Kanal) war in Aggregationen um den Nukleus lokalisiert (vergleiche Abb. 12 e mit Abb. 12 a, links unten). Nur einige wenige TRITC Signale waren im Zellkern sichtbar (Abb. 12 e, Mitte Links). Wenn beide Aufnahmen derselben Zelle übereinandergelegt wurden, wurde deutlich sichtbar, daß der überwiegende Teil des Gfi-II GFP Proteins und des Flag Pias3 Proteins in den Strukturen, die sich um den Zellkern geformt hatten, zusammen lokalisiert waren (Abb. 12 f). Nur wenig Flag Pias3 Protein war im Zellkern vorhanden und dort nicht mit Gfi-II GFP kolokalisiert (Abb. 12 f, Mitte). In einem weiteren Experiment wurden Gfi-III GFP und Flag Pias3 kotransfiziert. Die Signale im FITC Kanal zeigten eine Verteilung von Gfi-III GFP im Zellkern. Das Muster entsprach dabei der nach 2.7.2 zu erwartenden Verteilung (vergleiche Abb. 12 d mit Abb. 11 h). Auch die Signale im TRITC Kanal zeigten eine Verteilung von Flag Pias3 im Zellkern, die identisch mit dem Verteilungsmuster in „nuclear dots“ war (vergleiche Abb. 12 e mit Abb. 11 b). Ein Übereinanderlegen beider Bilder einer Zelle zeigte, daß die Signale von Gfi-III GFP und Flag Pias3 nicht notwendigerweise kolokalisiert waren (Abb. 12 i). Vielmehr waren beide Proteine offensichtlich unabhängig voneinander im Zellkern verteilt und überlappten in ihrer Verteilung höchstens zufällig (Abb. 12 i, Mitte unten).

Bei identischen Experimenten in 293 Zellen war zu beobachten, daß Gfi-I GFP und Flag Pias3 ebenfalls kolokalisieren. Jedoch war nach Kotransfektion die Gfi-1 Mutante Gfi-II GFP in 293 Zellen diffus über die gesamte Zelle verteilt (vergleichbar mit Abb. 11 e). Daher war es in diesem Fall nicht möglich eine Kolokalisation zwischen Gfi-II GFP und Flag Pias3 definitiv festzustellen (Daten nicht gezeigt, siehe auch Diskussion).

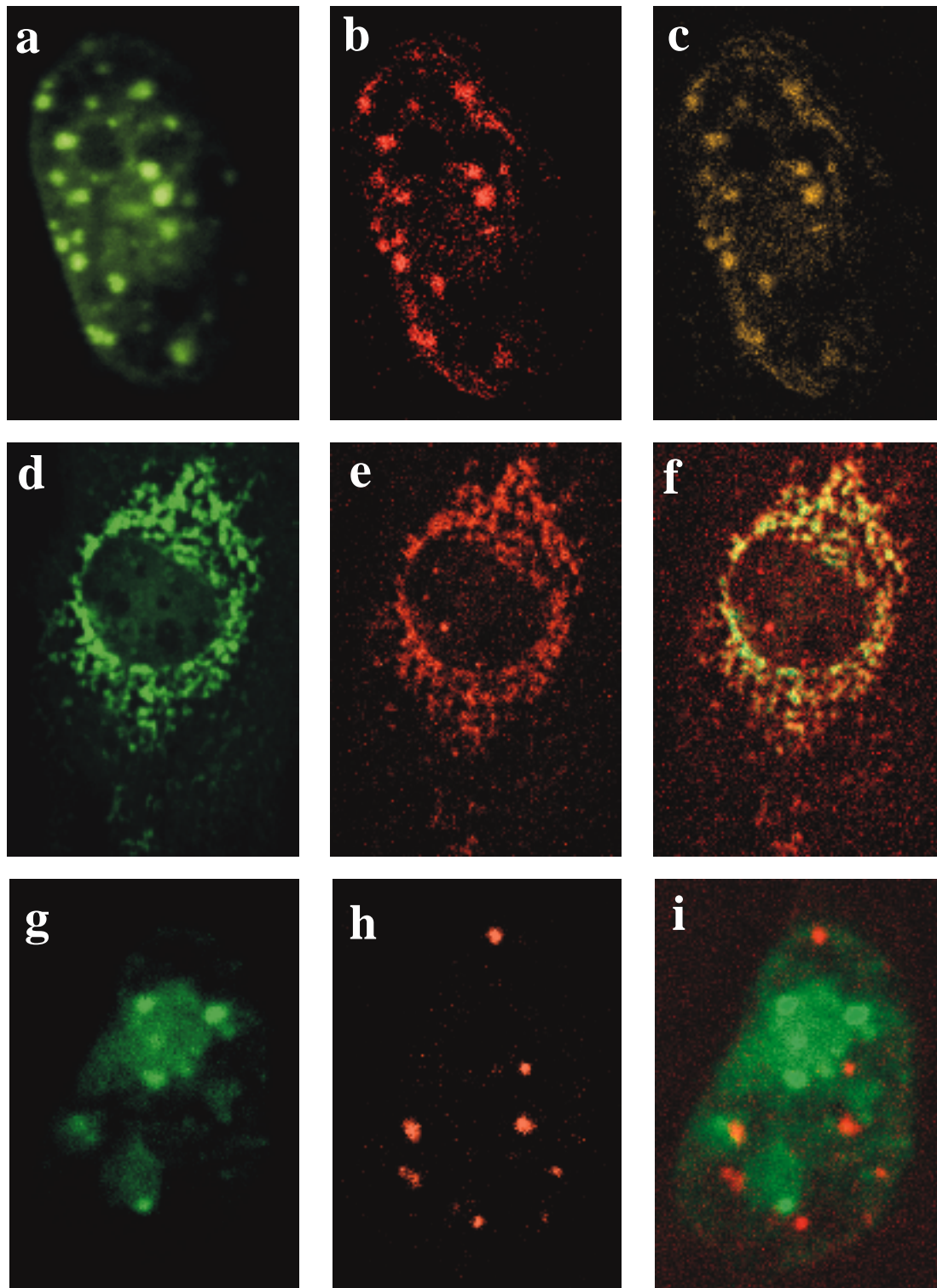


Abb. 12: Kolokalisationstudien zwischen Pias3, Gfi-1 und seinen Mutanten

NIH 3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, am nächsten Tag fixiert und gefärbt. Das „Flag Epitop“ wurde über einen Anti-Flag Antikörper und einen TRITC markierten Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das GFP Protein konnte direkt im FITC Kanal nachgewiesen werden (grün). Eine Zelle wurde zuerst im FITC Kanal und dann im TRITC Kanal photographiert. Die Bilder sind repräsentative Ausschnitte und wurden zur Anschaulichkeit nachher teilweise eingefärbt und überlagert.

- a) Gfi-I GFP (FITC), b) Flag Pias3 (TRITC), c) Überlagerung von a) und b)
- d) Gfi-II GFP (FITC), e) Flag Pias3 (TRITC), f) Überlagerung von d) und e)
- g) Gfi-III GFP (FITC), h) Flag Pias3 (TRITC), i) Überlagerung von g) und h)

2. Ergebnisse

Um zusätzlich sicherzustellen, daß alleine durch Kotransfektion die Verteilung eines GFP Proteins und Flag Pias3 nicht beeinflußt worden war, wurden 293 Zellen mit Cdk4 GFP und Flag Pias3 kotransfiziert. Cdk4 GFP ist unter normalen Umständen im Zytoplasma lokalisiert (Christoph Geisen, persönliche Mitteilung). Abb. 13 c zeigte die Übereinanderlagerung der Signale im FITC Kanal (Cdk4 GFP) und TRITC Kanal (Flag Pias3). Durch die Kotransfektion war die intrazelluläre Verteilung der beiden Proteine im Vergleich zu den einzeltransfizierten Zellen (vergleiche Abb. 11 b, bzw. Christoph Geisen, persönliche Mitteilung) nicht verändert.

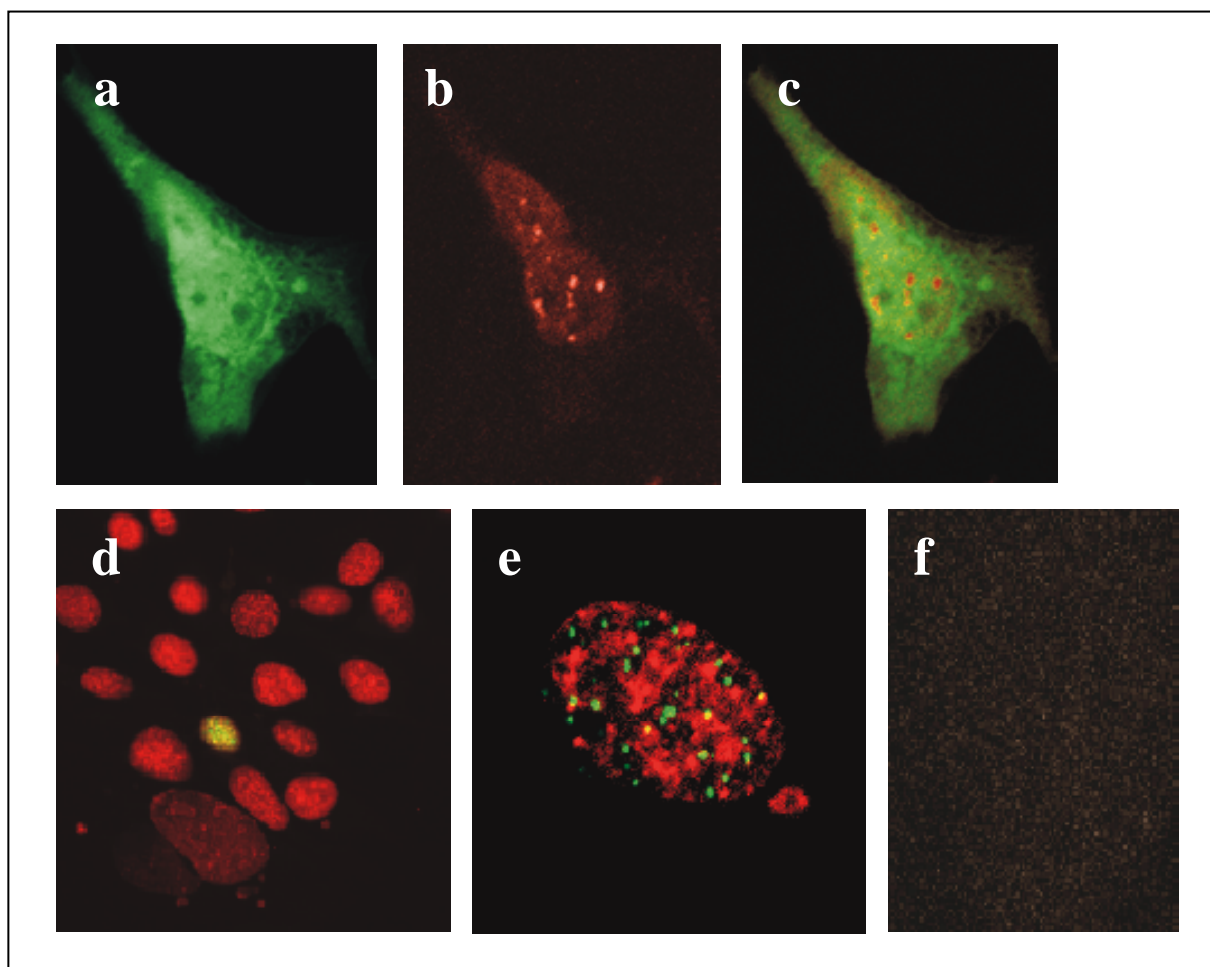


Abb. 13: Kontrolle zur Lokalisation von GFP Proteinen

293 bzw. NIH 3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, am nächsten Tag fixiert und gefärbt. Das „Flag Epitop“ wurde über einen Anti-Flag Antikörper und einen TRITC markierten Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das GFP Protein konnte direkt im FITC Kanal nachgewiesen werden (grün). Eine Zelle wurde zuerst im FITC Kanal und dann im TRITC Kanal photographiert. Die Bilder sind repräsentative Ausschnitte und wurden zur Anschaulichkeit eingefärbt und überlagert.

a) Cdk4 GFP (FITC), b) Flag Pias3 (TRITC), c) Überlagerung von a) und b) (293 Zellen)

d) Gfi-1B GFP, e) Pias1 GFP (NIH 3T3 Zellen, Kernfärbung durch Propidiumiodid)

f) Signaltrennung des LSM, Zellen die nur ein FITC Signal ausstrahlen im TRITC Kanal photographiert

Die Kolokalisationsstudien von Gfi-1 GFP bzw. den Gfi GFP Mutanten und Flag Pias3 in NIH 3T3 Zellen zeigten, daß der n-terminale Anteil außerhalb der Zinkfinger ausreicht, damit Gfi-1 und Pias3 kolokalisiert sind. Darüberhinaus führte die Kotretransfektion von Gfi-II GFP und Pias3 zu Aggregaten, die weitgehend verhinderten, daß Pias3 in den Zellkern transportiert wurde, bzw. Gfi-II GFP sich über die ganze Zelle verteilte. Die Aggregate entstanden i. d. R. um den Zellkern herum, wobei unklar war, ob es sich um ein zelluläres Kompartiment handelte. Aufgrund ihrer Morphologie, konnte man schließen, daß es sich jedoch mit ziemlicher Sicherheit nicht um den Golgi-Apparat, das Endoplasmatische Retikulum oder um lysosomale Kompartimente handelt (H. P. Elssässer, persönliche Mitteilung). Die Experimente zur intrazellulären Lokalisation und Interaktion von Gfi-1 und Pias3 bestätigen somit die Resultate der biochemischen Interaktionsstudien von Gfi-1 und Pias3 (siehe 2.2, 2.6).

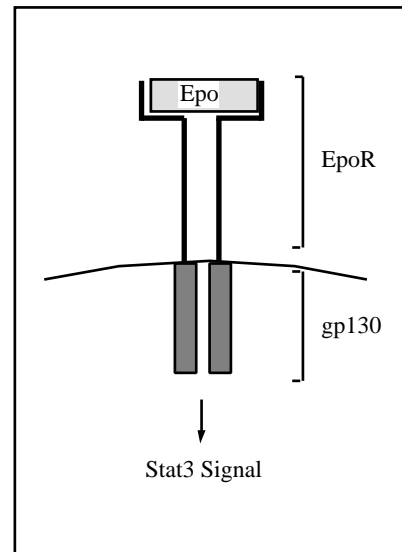
2.9 Gfi-I GFP und Pias3 GFP wirken auf die intrazelluläre Verteilung von aktiviertem Stat3

Von Pias3 ist bekannt, daß es auf aktivierte Stat3 Proteine wirkt und deren DNA-Bindung und damit die Transaktivierung der Stat3 Zielgene verhindert (Chung et al., 1997). Es war daher von Interesse, ob eine Aktivierung von Stat3 in Gegenwart von Pias3, welches der physiologischen Situation entspricht, da beide Proteine weitgehend ubiquitär exprimiert werden (Heinrich et al., 1998, Chung et al., 1997, vergleiche 2.5), anders verlief als in Gegenwart von Gfi-1. Um gezielt in transfizierten Zellen Stat3 aktivieren zu können, wurde ein Konstrukt, das für einen chimären Rezeptor kodiert, in NIH 3T3 Zellen kotransfiziert (Schapers, persönliche Mitteilung). Dieser chimäre Rezeptor besteht aus dem extrazellulären Anteil des Erythropoetinrezeptors und aus dem intrazellulären Anteil von gp130 (zur Funktion von gp130 siehe 1.4). Auf diese Weise konnte über Erythropoetinzugabe intrazellulär ein Signal von gp130 und dadurch eine Stat3 Aktivierung ausgelöst werden (Abb. 14). Das aktivierte Stat3 Protein konnte mit einem Stat3 phosphotyrosinspezifischen Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Spezifität der Aktivierung und des Antikörpers konnte durch eine Stat3 Mutante (Stat3F, siehe Fukada et al., 1998), in der das phosphorylierbare Tyrosin gegen ein Phenylalanin ausgetauscht worden war, im voraus überprüft werden (Daten nicht gezeigt).

Abb. 14: Das Erythropoetin gp130 System zur Aktivierung von Stat3 *in-vivo*

Die Zeichnung zeigt schematisch die Aktivierung von Stat3 über den chimären Rezeptor.

EpoR: extrazellulärer Anteil des Erythropoetinrezeptors, gp130 intrazellulärer Anteil von gp130, Epo: Erythropoetin



2.9.1 Pias3 GFP und aktiviertes Stat3 sind unmittelbar nach der Aktivierung im Zellkern kolokalisiert

Um die Verteilung von aktiviertem Stat3 Protein in transfizierten Zellen zu verfolgen und mit der Pias3 Verteilung zu vergleichen, wurden in einem Ansatz der chimäre Rezeptor, Stat3, und Pias3 GFP kotransfiziert, durch Erythropoetinzugabe 5 Minuten lang aktiviert, in normalen Medium inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten fixiert und gefärbt.

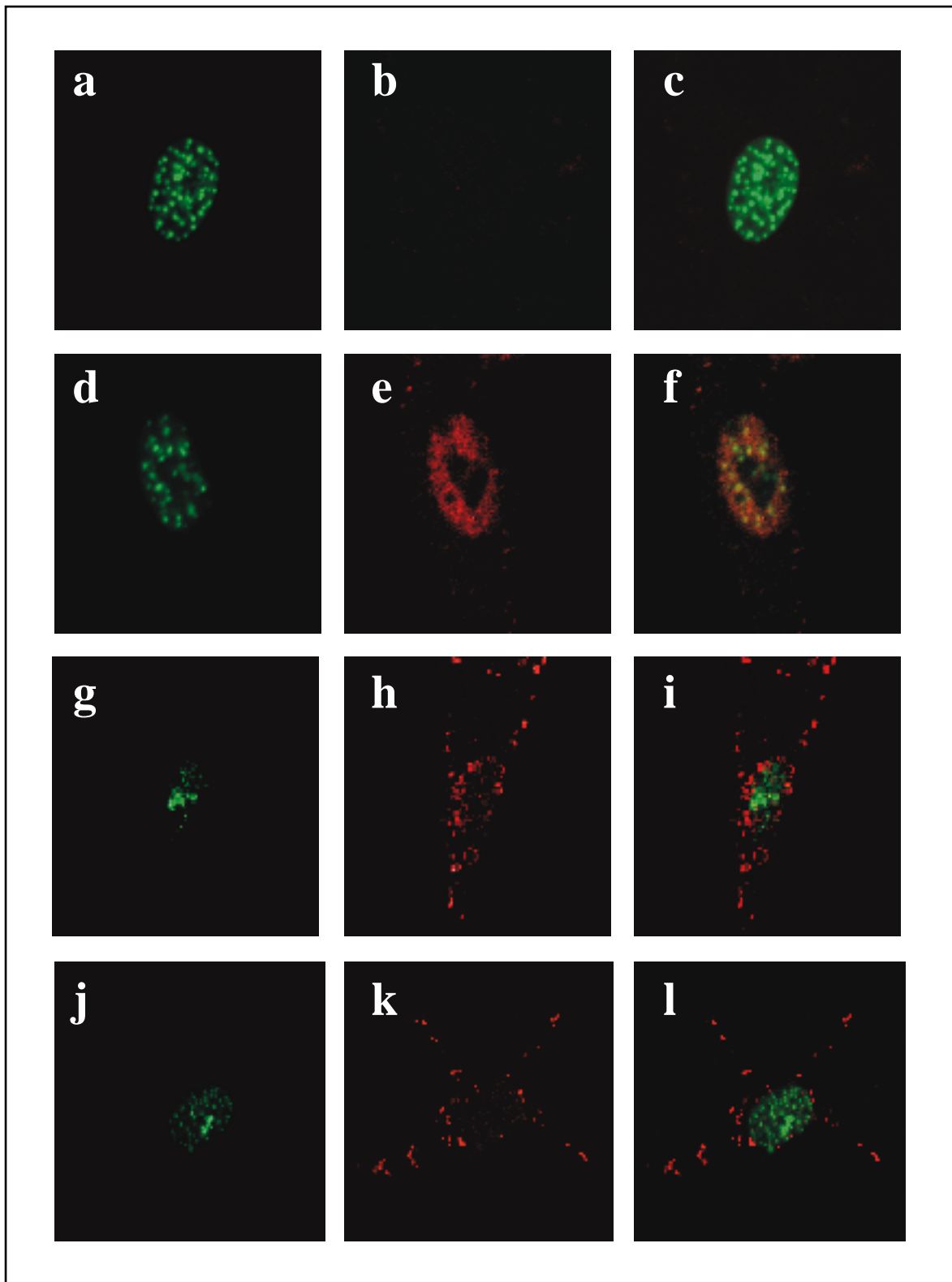
In den mit Pias3 GFP und Stat3 transfizierten Zellen war ohne Erythropoetinzugabe kein aktiviertes Stat3 Protein detektierbar (TRITC Kanal, Abb. 15 b), während das Pias3 GFP (FITC Kanal) die schon beobachtete nukleäre Verteilung zeigte (vergleiche Abb. 15 a oder 15 c mit Abb. 11 a). Nach 5 minütiger Aktivierung war intrazellulär an der Zellmembran aktiviertes Stat3 nachweisbar (TRITC Kanal, Abb. 15 e). Hier fand die Phosphorylierung der Stat3 Proteine durch die Rezeptorkomplexe statt (vergleiche 1.2, 1.4). Die Position der Rezeptorkomplexe an der Innenseite der Zellmembran konnte durch eine Überlagerung der zwei Fluoreszenzen mit einem Phasenkontrastbild der gleichen Zelle bestätigt werden (Abb. 16). Weiterhin war aktiviertes Stat3 Protein im Kern detektierbar, welches hauptsächlich in Form einzelner Punkte vorlag. Die intrazelluläre Pias3 GFP Verteilung (FITC Kanal) wurde von dem aktivierten Stat3 nicht beeinflusst (vergleiche Abb. 15 d mit 15 a). Beim Überlagern der Bilder von 15 d und 15 e ergab sich, daß ein großer Teil der

aktivierten Stat3 Proteine mit dem Pias3 GFP Protein in den gleichen intranukleären Strukturen lokalisiert war (Abb. 15 f). 30 Minuten nach Beginn der Stat3 Aktivierung zeigte sich, daß die Menge des aktivierten Stat3 Proteins zurückgegangen war (TRITC Kanal, Abb. 15 h). An der Zellmembran waren deutlich weniger Rezeptorkomplexe detektierbar und in einigen Zellen fand man jetzt eine Verteilung des aktivierten Stat3 Proteins in der Nähe der Kernmembran (Abb. 15 h und 15 i). Die intranukleäre Pias3 GFP Verteilung hatte sich hingegen nicht verändert (vergleiche Abb. 15 g mit 15 a). Ähnliche Verteilungen von aktivierten Stat3 Komplexen ließen sich auch 60 Minuten nach der Aktivierung beobachten (Daten nicht gezeigt). 2 Stunden nach Beginn der Aktivierung war in den meisten Zellen nur noch wenig aktiviertes Stat3 Protein zu detektieren (Abb. 15 k). Die Pias3 GFP Verteilung entsprach dem bereits mehrfach beobachteten Muster (vergleiche Abb. 15 j mit 15 a). Generell stimmt die Kinetik der Stat3 Aktivierung in diesem Experiment mit publizierten Beobachtungen überein (Heinrich et al., 1998). Auffällig war, daß ca. 30 Minuten nach Ende der Aktivierung Zellen zu beobachten waren, in denen das aktivierte Stat3 Protein nicht mehr in Punkten über den Zellkern verteilt war, sondern sich in der Nähe der Kernmembran außen um den Kern herum ansammelte. Dieses Muster war jedoch nicht bei allen Zellen einheitlich, was mehrere Ursachen haben kann (siehe Diskussion). Die Verteilung von Pias3 GFP Protein schien durch die Stat3 Aktivierung nicht beeinflusst zu werden. Unmittelbar nach der Stat3 Aktivierung fanden sich beide Proteine aber in den gleichen Strukturen im Zellkern (Abb. 15 f). Dies stimmte mit dem Modell einer Hemmung der Stat3 Aktivität durch Pias3 überein (Chung et al., 1997) und konnte hier zum ersten Mal auch visuell dargestellt werden.

Abb. 15 (nächste Seite): Immunfluoreszenz von Pias3 GFP und phosphoryliertem Stat3

NIH 3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, am nächsten Tag fixiert und gefärbt. Das tyrosinphosphorylierte Stat3 Protein wurde über einen Anti-Phospho Stat3 Antikörper und einen TRITC markierten Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das GFP Protein konnte direkt im FITC Kanal nachgewiesen werden (grün). Eine Zelle wurde zuerst im FITC Kanal und dann im TRITC Kanal photographiert. Die Bilder sind repräsentative Ausschnitte und wurden zur Anschaulichkeit nachher teilweise eingefärbt und überlagert.

- a) – c): keine Aktivierung von Stat3: a) Pias3 GFP, b) Anti-Phospho Stat3, c) Überlagerung von a) und b)
- d) – f): 5 Minuten Aktivierung von Stat3: d) Pias3 GFP, e) Anti-Phospho Stat3, f) Überlagerung von d) und e)
- g) – i): 25 Minuten nach Aktivierungsende von Stat3: g) Pias3 GFP, h) Anti-Phospho Stat3, i) Überlagerung von g) und h)
- j) – l): 2 h nach Aktivierungsende von Stat3: j) Pias3 GFP, k) Anti-Phospho Stat3, l) Überlagerung von j) und k)



2.9.2 Gfi-I GFP verändert möglicherweise die intranukleäre Verteilung von aktiviertem Stat3 Protein

Aus den bisherigen Experimenten mit Gfi-1 und Pias3 kann man schließen, daß beide Proteine in denselben Zellen exprimiert sein können und miteinander interagieren (siehe 2.2, 2.5, 2.6, 2.8). In NIH 3T3 Zellen ist bereits endogenes Pias3 Protein vorhanden und kann vermutlich die Stat3 Signaltransduktion hemmen (Chung et al., 1997). Da Pias3 GFP mit Stat3 unmittelbar nach dessen Aktivierung kolokalisiert ist (siehe oben), ist es wichtig zu klären, ob Gfi-1 über die Interaktion mit Pias3 auf die Stat3 Aktivierung einwirken kann. Daher wurden mit dem gleichen experimentellen Ansatz wie in 2.9.1 Gfi-I GFP und Stat3 kotransfiziert und die Stat3 Aktivierung wurde über Erythropoetin kontrolliert (Abb. 14). Sowohl mit als auch ohne Zugabe von Erythropoetin zeigte die Verteilung von Gfi-I GFP (FITC Kanal, Abb. 17 a bzw. 17 d) keine Veränderung im Vergleich zu der vorher beobachteten Verteilung von Gfi-I GFP (Abb. 11 a). Ohne Aktivierung durch Erythropoetin fand sich in einigen mit Gfi-I GFP transfizierten Zellen bereits ein deutlich sichtbares Signal an phosphoryliertem Stat3 (Daten nicht gezeigt). Es war nicht klar, ob es sich hier um einen Beobachtungsfehler oder um eine bereits durch die Gfi-I GFP Anwesenheit verursachte Voraktivierung von Stat3 handelte (siehe Diskussion). Als repräsentatives Bild wurde eine Zelle ausgewählt, in der keine starke Voraktivierung sichtbar war (TRITC Kanal, Abb. 17 b). Nach 5 minütiger Aktivierung von Stat3 durch Erythropoetin zeigte sich in allen beobachteten Zellen eine diffuse Kernverteilung von aktiviertem Stat3 Protein (TRITC Kanal, Abb. 17 e). Dieses Verteilungsmuster unterschied sich von der vorher beobachteten Verteilung bei Anwesenheit von Pias3 GFP (vergleiche Abb. 15 e mit Abb. 17 e). In Anwesenheit von Gfi-I GFP lag das aktivierte Stat3 Protein nicht mehr in Form von einzelnen Punkten im Kern vor, sondern war gleichmäßig verteilt. Eine Überlagerung des TRITC Kanals (Stat3) und des FITC Kanals (Gfi-I GFP) zeigte keine explizite Kolokalisation von Gfi-1 und aktiviertem Stat3. Beide Proteine waren im Kern unabhängig voneinander angeordnet.

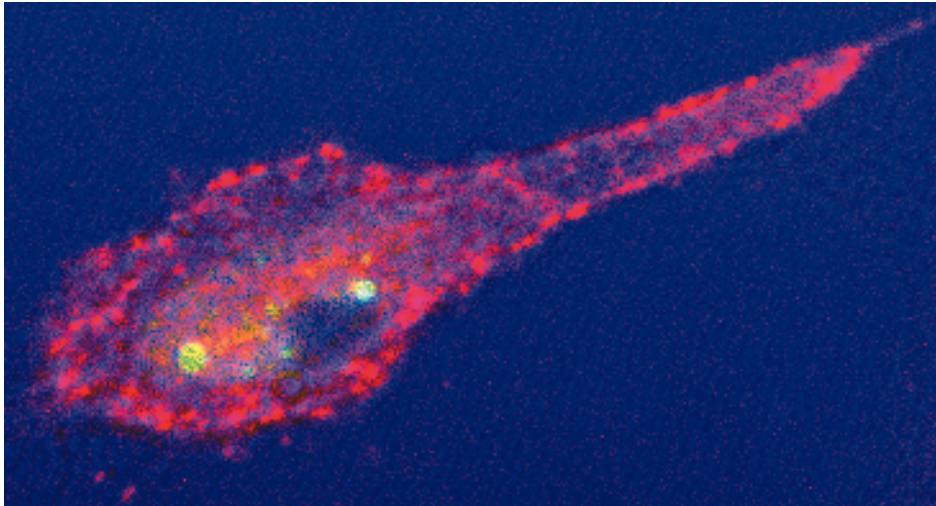


Abb. 16: Rezeptorkomplexe mit aktiviertem Stat3 an der Zellmembran

Überlagerung des TRITC- und des FITC Kanals mit dem entsprechenden Phasenkontrastbild der Zelle nach 5 minütiger Aktivierung der Stat3 Phosphorylierung.

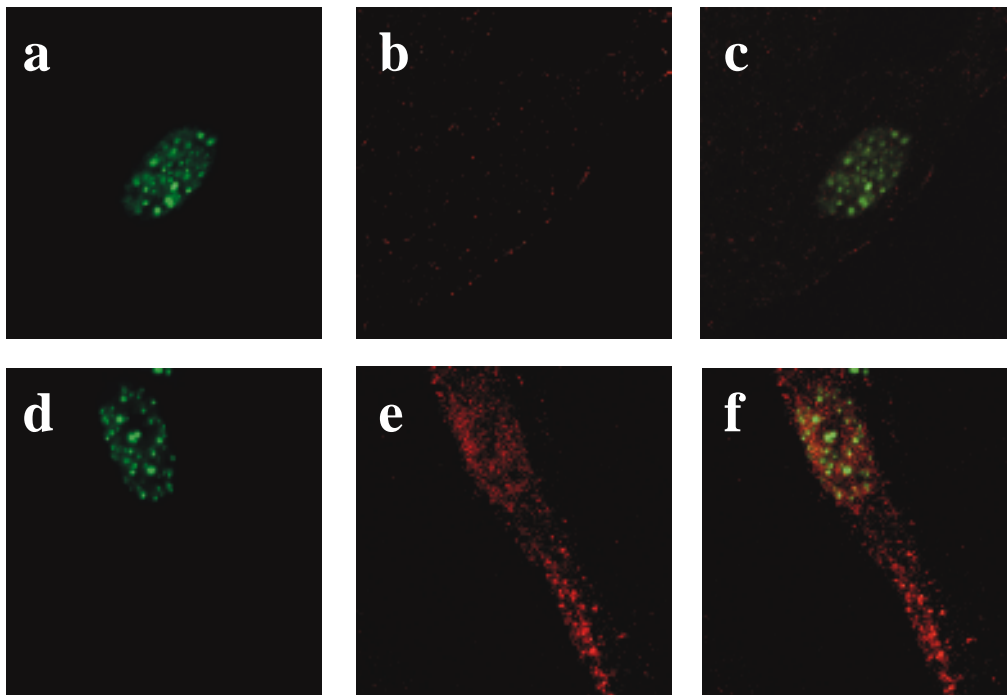


Abb. 17: Immunfluoreszenz von Gfi-1 GFP und phosphoryliertem Stat3

NIH 3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, am nächsten Tag fixiert und gefärbt. Das tyrosinphosphorylierte Stat3 Protein wurde über einen Anti-Phospho Stat3 Antikörper und einen TRITC markierten Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das GFP Protein konnte direkt im FITC Kanal nachgewiesen werden (grün). Eine Zelle wurde zuerst im FITC Kanal und dann im TRITC Kanal photographiert. Die Bilder sind repräsentative Ausschnitte und wurden zur Anschaulichkeit nachher teilweise eingefärbt und überlagert.

a) – c): keine Aktivierung von Stat3: a) Gfi-1 GFP, b) Anti-Phospho Stat3, c) Überlagerung von a) und b)
d) – f): 5 Minuten Aktivierung von Stat3: d) Gfi-1 GFP, e) Anti-Phospho Stat3, f) Überlagerung von d) und e)

2.10 Gfi-1 verstärkt die Transkription Stat3 abhängiger Promotoren in Reporterger Assays ohne selbst DNA zu binden

2.10.1 Der -Antichymotrypsinpromotor als Ziel einer Stat3 Transaktivierung

Von Pias3 ist bekannt, daß es die Transaktivierung von Stat3 Zielgenen durch Stat3 unterbinden kann (Chung et al., 1997). Es stellt sich daher die Frage, ob der indirekte Einfluß von Gfi-1 über Pias3 auf Stat3 sich ebenfalls auf die Funktion von Stat3 als transkriptioneller Aktivator und somit auf die Zielgene von Stat3 auswirkt (siehe auch 1.4). Es sind einige Zielgene bekannt, die durch Stat3 reguliert werden (siehe 2.4). Ein Beispiel ist der -Antichymotrypsinpromotor der Ratte (Kordula et al., 1998). Daher wurde zur Untersuchung von Effekten auf die Zielgene von Stat3 ein Konstrukt als Reporter verwendet, bei dem der Teil des -Antichymotrypsinpromotors der Ratte, der die Stat3 DNA-Bindestellen enthält, sich vor einem Luciferasegen befindet (Abb. 18 c, F. Schapers, persönliche Mitteilung, Kordula et al., 1998). Als System für eine Stat3 Aktivierung wurden HepG2 Zellen verwendet, in denen nach Interleukin 6 Stimulation Stat3 phosphoryliert werden kann. HepG2 Zellen haben auch endogenes Stat3 Protein (Daten nicht gezeigt). Insgesamt beziehen sich die angegebenen Mengen an eingesetzten Plasmiden immer auf 6 Werte, wobei 3 Werte nach Interleukin 6 Stimulation und die anderen 3 Werte ohne Interleukin 6 Stimulation vermessen und zusammengefaßt wurden. Bei einigen Experimenten wurde zusätzlich ein Konstrukt kotransfiziert, was für Stat3 kodiert (J. Darnell, T. Hirano, persönliche Mitteilung). Zuerst wurde der Reporter in HepG2 Zellen auf seine spezifische Induzierbarkeit durch Stat3 getestet (Abb. 18 a). Die Reporteraktivität war durch die Zugabe von Interleukin 6 ins Medium um den Faktor 20 stimulierbar. Kotransfektion von einem Stat3wt Konstrukt verstärkten die Reporteraktivität nur nach Interleukin 6 Zugabe (Abb. 18 a, Spalte 1 und 2), wogegen Kotransfektion von gleichen Mengen dominant negativ wirkender Stat3 Mutanten die Reporteraktivität nach Interleukin 6 Stimulation hemmen konnte (Abb. 18 a Spalten 3 - 5). In der Stat3F Mutante liegt ein Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin vor, so daß dieses Stat3 Protein nicht mehr tyrosinphosphoryliert werden und daraufhin dimerisieren (Fukada et al., 1998, vergleiche auch 2.9 bzw. 1.4) kann. Der dominant-negative Effekt von Stat3F liegt vermutlich in einer Konkurrenz mit Stat3wt um aktivierte Rezeptorkomplexe (F. Schapers, persönliche Mitteilung). Die Mutante Stat3D kann aufgrund eines Aminosäureaustausches in der DNA-bindenden Domäne keine DNA mehr binden (Fukada et al., 1998). Stat3

Dimere, die nur ein Molekül Stat3D enthalten sind daher inaktiv, da sie ohne DNA-Bindung nicht mehr transaktivieren können. Auch ohne Kotransfektion von Stat3 war der Reporter allein durch das endogene Stat3 mit Interleukin 6 aktivierbar (Abb. 19 a Spalten 1 und 2) Ein Reporter der den SV40 Promotor/Enhancer enthält (pGL3 Control, Promega), ließ sich durch die Zugabe von Stat3 und/oder Interleukin 6 nicht stimulieren, sondern wurde sogar leicht reprimiert (Daten nicht gezeigt). Andere STAT-Proteine konnten diesen Reporter nicht aktivieren (T. Schmidt, persönliche Mitteilung). Bei allen Reporterexperimenten wurde darauf geachtet, daß die absolute Menge eines transfizierten Expressionsvektors während einer Versuchsreihe immer gleich war und wurde, wenn nötig, durch den entsprechenden Leervektor ergänzt. Die Experimente in den HepG2 Zellen zeigten, daß mit der Transfektion dieser Zelllinie durch den -Antichymotrypsinpromotor Luciferase Reporter und anschließender gezielter Stimulierung durch Interleukin 6 ein spezifisches, die Stat3 Transaktivierung messendes, System vorhanden war (vergleiche auch Heinrich et al., 1998). Andere Effekte auf den Reporter, die z. B. aus Zellzyklusaktivierung o. ä. bestehen, konnten durch Kontrollen ausgeschlossen werden bzw. waren durch die kurze Dauer der Interleukin 6 Stimulierung von vornherein unmöglich (siehe Material und Methoden).

2.10.2 Pias3 reprimiert die Stat3 Aktivierung des -Antichymotrypsinpromotors

Von Pias3 ist bekannt, daß es die Transaktivierung von Stat3 Zielgenen verhindern kann, in dem es vermutlich aktivierte Stat3 Proteine im Zellkern abfängt und deren DNA-Bindung verhindert (Chung et al, 1997, vergleiche 1.4). Dieser Effekt ist u. a. mit Hilfe eines artifiziellen Reporters, der multimerisierte Stat3 Bindestellen aus dem IRF-1 Promotor enthält (siehe 1.4), in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen worden (Chung et al., 1997). Der -Antichymotrypsinpromotor war wie oben beschrieben von der Transaktivierung durch Stat3 abhängig und konnte ebenfalls durch Pias3 reprimiert werden (Abb. 18 b Spalten 3 - 8). Die Repression war von der Menge des kotransfizierten Pias3 Expressionsplasmides abhängig und der maximal erzielbare Repressionsgrad lag unter diesen experimentellen Bedingungen bei ca. 70% (Abb. 18 b Spalten 7 - 8). Dies war ein deutlich schwächerer Wert als die bereits publizierten 100% für den synthetischen Reporter (Chung et al., 1997), was vermutlich daran lag, daß bei diesem Experiment ein nativer Promotor und keine multimerisierten Bindungsstellen verwendet worden sind

(siehe oben). Dennoch war auch dieses System geeignet, die Repression der Stat3 Aktivierung durch Pias3 zu messen.

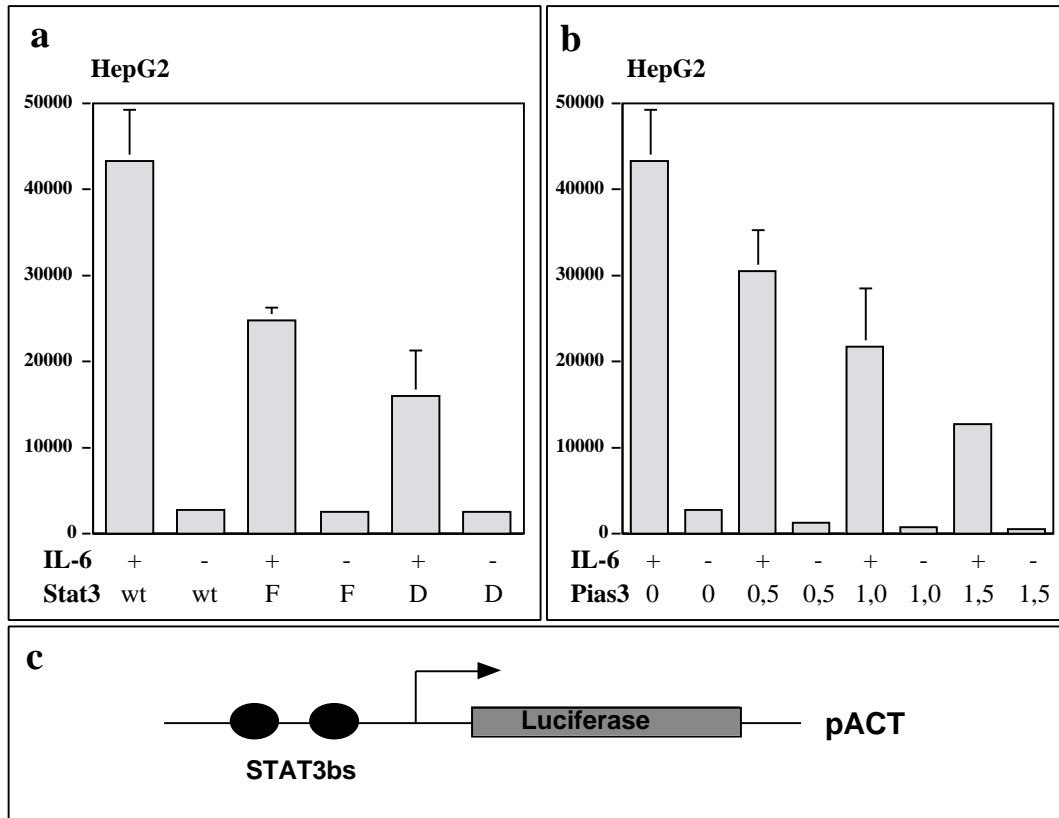


Abb. 18: Messung der Stat3 Aktivität durch den -Antichymotrypsinpromotor

Die Balken repräsentieren den Mittelwert dreier Messungen in einem Experiment in HepG2 Zellen und der Fehlerbalken entspricht der jeweiligen Standardabweichung. Die Einheit der Y-Achse sind RLU (Relative Luciferase Units). Das Experiment ist mindestens zweimal mit identischen Resultaten wiederholt worden. Die An- bzw. Abwesenheit von Interleukin 6 ist durch ein + bzw. – Zeichen angedeutet worden.

a) Induktion und Repression des Promotors durch Stat3wt bzw. dominant negatives Stat3F oder Stat3D (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte)

b) Repression des Promotors durch steigende Mengen an Pias3 Expressionsplasmid (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte, die Mengen an Pias3 Expressionsplasmid in Abb. 18 b beziehen sich auf 6 Werte in 3 cm Ø Schalen (= 6 fachen Menge für 24 Loch Platten))

c) Schematische Darstellung des -Antichymotrypsinpromotor Luciferase Konstruktes pACT. Die Stat3 Bindestellen sind durch Kreise und die Initiationsstelle der Transkription durch einen Pfeil angedeutet.

2.10.3 Gfi-1 und Gfi-II Kotransfektionen verstärken das Stat3 Signal nach Interleukin 6 Stimulation

Die Immunfluoreszenzexperimente in 2.9 haben einen ersten Hinweis darauf gegeben, daß Gfi-1 die Signaltransduktion von Stat3 beeinflussen kann. Deshalb wurde die Fähigkeit von Interleukin 6 den Stat3 abhängigen Reporter zu stimulieren bei steigenden Konzentrationen

von kotransfiziertem Gfi-1 Expressionsvektor gemessen (Abb. 19 a). Bei diesem Experiment ist kein Stat3 Expressionsplasmid hinzugegeben worden und es wurde nur die Aktivierung des endogenen Stat3 gemessen. Bei steigenden Konzentrationen des Gfi-1 Expressionsplasmides nahm die Reporteraktivität kontinuierlich zu, bis sie ein Optimum bei 0,6 µg LTR Gfi-1 / 6 Werte erreicht hatte und dann wieder abfiel. Die Höhe der Aktivität am Optimum war vergleichbar mit der Aktivitätshöhe, die durch Kotransfektion von Stat3wt erreichbar war (Abb. 18 a, Spalte 3 und 4). Durch Zugabe von Gfi-1 Expressionsvektor konnte die Stat3 abhängige Aktivierung des Reporters unter günstigen Bedingungen ca. 7 fach verstärkt werden (vergleiche Abb. 19 a Spalte 1 mit Spalte 7). Selbst außerhalb des Optimums von 0,6 µg LTR Gfi-1 / 6 Werte fand bei allen anderen Konzentrationen von Gfi-1 Expressionsplasmid noch eine mindestens 2 - 3 fache Verstärkung der Reporteraktivierung statt. Die Verstärkungswirkung fiel dabei bei höheren Konzentrationen wieder ab und erreichte ein Plateau (Abb. 19, Spalten 7 - 15). Vermutlich war die Verfügbarkeit anderer Faktoren limitierend für eine weitere Steigerung der Reporteraktivität (siehe auch Diskussion). Die Fähigkeit von Gfi-1 die Interleukin 6 abhängige Stimulation des Reporters zu steigern war unabhängig von kotransfiziertem Stat3wt Expressionsplasmid (Daten nicht gezeigt). Da die Möglichkeit bestand, daß die Kotransfektion von Gfi-1 die Transkription eines Gfi-1 Zielgenes beeinflusste, das dann wiederum auf die Stat3 Signaltransduktion wirkte, ist dasselbe Experiment in Abb. 19 b mit einem Expressionsvektor, der den Bereich von Gfi-1 außerhalb der Zinkfinger enthielt und als „RGS His-Epitop“ exprimiert (His Gfi-II, siehe 2.1 bzw. 2.6), wiederholt worden. Das Expressionskonstrukt His Gfi-II war ebenfalls in der Lage konzentrationsabhängig die Reporteraktivität nach Interleukin 6 Stimulation zu verstärken (Abb. 19 b). Diese Experimente zeigten das Gfi-1 in HepG2 Zellen die Stat3 Wirkung auf den Promotor eines Zielgenes verstärken kann. Der Verstärkereffekt ist konzentrationsabhängig und unabhängig von den DNA-bindenden Eigenschaften von Gfi-1.

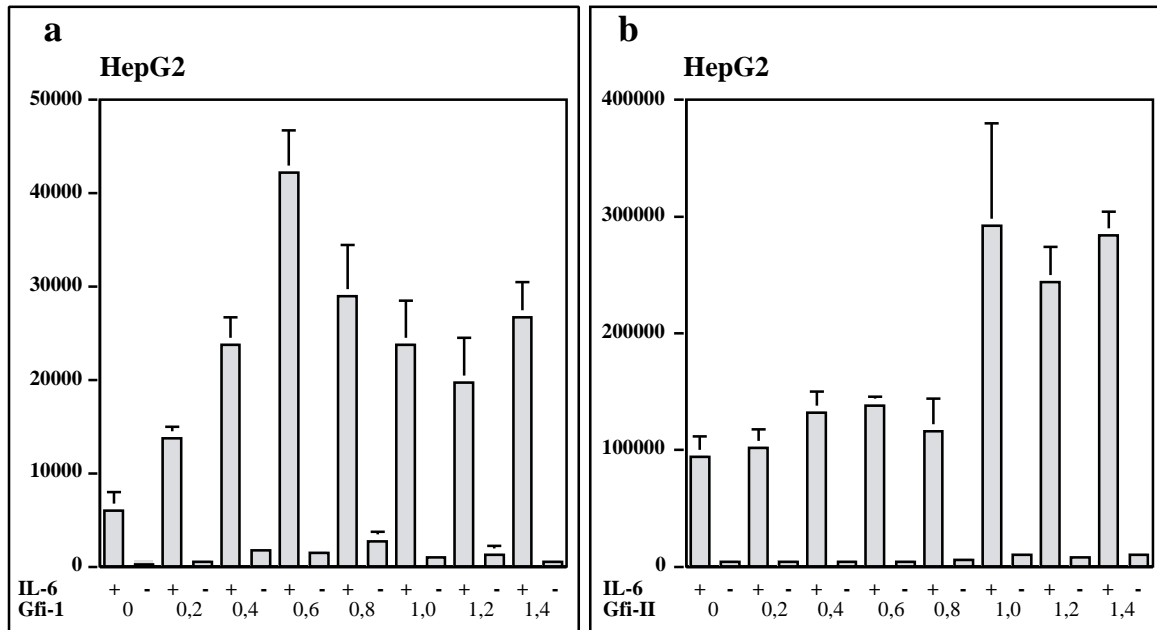


Abb. 19: Messung der Stat3 Aktivität mit dem -Antichymotrypsinpromotor nach Kotransfektion von LTR Gfi-1 oder LTR His Gfi-II

Die Balken repräsentieren den Mittelwert dreier Messungen in HepG2 Zellen und der Fehlerbalken entspricht der jeweiligen Standardabweichung. Die Einheit der Y-Achse sind RLU (Relative Luciferase Units). Das Experiment ist mindestens zweimal mit identischen Resultaten wiederholt worden. Die An- bzw. Abwesenheit von Interleukin 6 ist durch ein + bzw. – Zeichen angedeutet worden. Der Faktor 10 in der Aktivierung von 19 a und 19 b geht auf eine Veränderung der Meßmethode zurück.

a) Einfluß von steigenden Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid auf den Reporter (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte, die Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid in Abb. 19 a beziehen sich auf 6 Werte)

a) Einfluß von steigenden Mengen an His Gfi-II Expressionsplasmid auf den Reporter (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte, die Mengen an His Gfi-II Expressionsplasmid in Abb. 19 b beziehen sich auf 6 Werte)

2.10.4 Der Anteil von Gfi-1 außerhalb der Zinkfinger reicht für eine Aufhebung der Repression der Stat3 Signaltransduktion durch Pias3 aus

Da Gfi-1 und Pias3 gegenteilig auf die Aktivität eines Stat3 abhängigen Reporters wirken und miteinander interagieren können, stellte sich die Frage, ob Gfi-1 die Repression des Stat3 abhängigen Reporters durch Pias3 modulieren konnte. Die Repression des Stat3 Reporters durch Pias3 lag bei ca. 70%, wenn 0,2 µg Pias3 Expressionsplasmid eingesetzt wurden (Abb. 20 a Spalten 1 und 3, siehe auch 2.10.2). Dazu wurden nun bei konstanter Menge an Pias3 Expressionsplasmid steigende Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid in dem Transfektionsexperiment eingesetzt (Abb. 20 a Spalten 5 - 10). Diese Versuchsreihe zeigte, daß bei zunehmender Menge an eingesetztem Gfi-1 Expressionsplasmid die Repression des Stat3 abhängigen Reporters durch Pias3 schrittweise aufgehoben werden konnte. Bei einer Menge von 1,5 µg LTR Gfi-1 / 6 Werte war die Repression des Stat3 ab-

hängigen Reporters durch Pias3 vollständig verschwunden (Abb. 20 a vergleiche Spalte 1 mit Spalte 9). Auch wenn geringere Mengen als 0,5 µg LTR Gfi-1 eingesetzt wurden, fand schon eine teilweise Aufhebung der Repression durch Pias3 statt (Daten nicht gezeigt). Derselbe Effekt einer Aufhebung der Repression durch Pias3 ließ sich analog dazu auch dadurch erzielen, daß anstatt von Gfi-1 die Mutante His Gfi-II in Form steigender Mengen eines Expressionsplasmides zu dem Ansatz gegeben wurde (Abb. 20 b, Spalten 1 - 6).

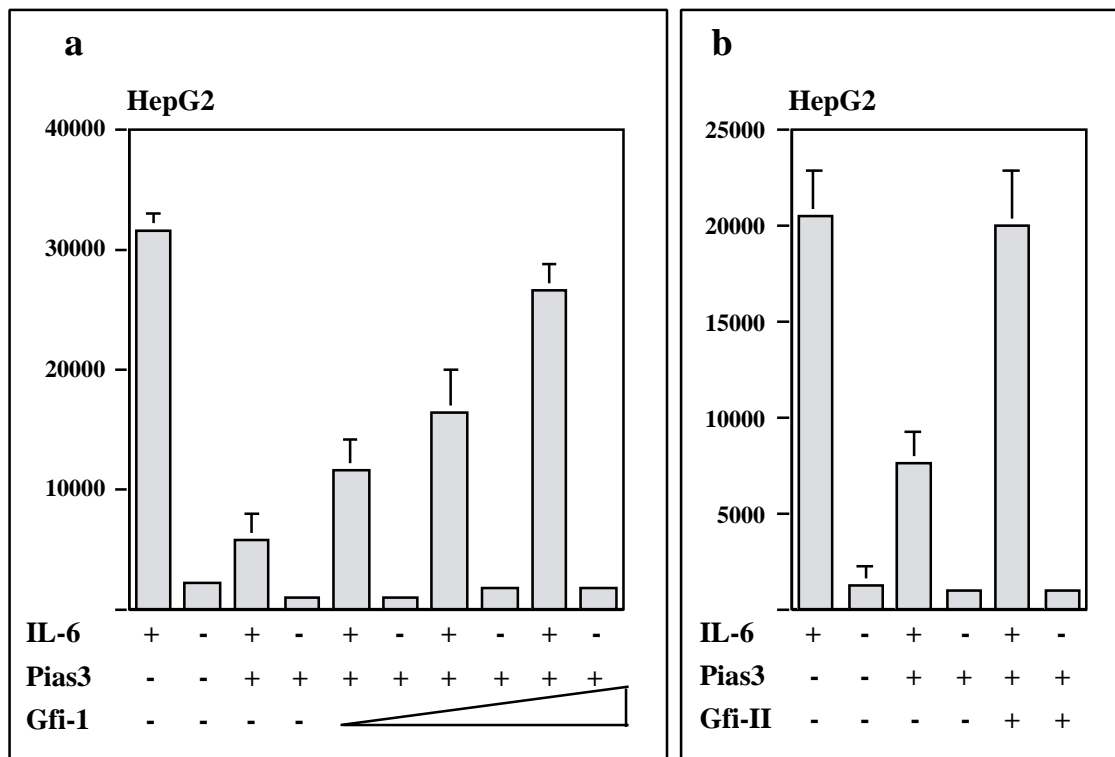


Abb. 20: Messung der Stat3 Aktivität mit dem -Antichymotrypsinpromotor nach Kotransfektion von Pias3 und Gfi Expressionsplasmiden

Die Balken repräsentieren den Mittelwert dreier Messungen in HepG2 Zellen und der Fehlerbalken entspricht der jeweiligen Standardabweichung. Die Einheit der Y-Achse sind RLU (Relative Luciferase Units). Das Experiment ist mindestens zweimal mit identischen Resultaten wiederholt worden. Die An- bzw. Abwesenheit von Interleukin 6 ist durch ein + bzw. - Zeichen angedeutet worden.

a) Einfluß von steigenden Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid auf den Reporter in Anwesenheit von Pias3 (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte, 0,2 µg Pias3 Expressionsplasmid / 6 Werte, die Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid in Abb. 20 a (0,5 µg, 1,0 µg, 1,5 µg) beziehen sich auf 6 Werte)

Aus dem Mengenverhältnis der eingesetzten Expressionsplasmide (0,2 µg Pias3 zu bis zu 1,5 µg LTR Gfi) kann nicht auf die Wirksamkeit der jeweiligen Proteine auf die Stat3 Signaltransduktion geschlossen werden, da Pias3 ubiquitär exprimiert ist (siehe 2.5) und in HepG2 Zellen somit endogenes Pias3 vorhanden ist. Weiterhin besitzt das Pias3

Expressionsplasmid einen CMV Promotor, welcher vermutlich deutlich stärker ist, als der LTR Promotor der Gfi Expressionsplasmide.

Die Transfektionsexperimente mit Gfi-1, Pias3 und dem Stat3 abhängigen -Antichymotrypsinpromotor zeigten, daß Pias3 und Gfi-1 antagonistisch auf die Stat3 Signaltransduktion wirken. Pias3 reprimiert die Transaktivierung des Stat3 abhängigen Promotors (2.10.2, Chung et al., 1997), Gfi-1 verstärkt die Transaktivierung des Stat3 abhängigen Promotors (2.10.3). Für die Verstärkerfunktion von Gfi-1 ist der Zinkfinger und damit die Fähigkeit von Gfi-1 DNA zu binden nicht notwendig (2.10.3, siehe auch Diskussion). Daher kann man davon ausgehen, daß Gfi-1 nach dem gleichen Prinzip auf die Stat3 Signaltransduktion wirkt wie Pias3, nämlich indem es mit einer Komponente des Signaltransduktionsweges interagiert und so den gesamten Signalweg moduliert. Gfi-1 kann dabei die hemmende Wirkung von Pias3 auf den Stat3 abhängigen Reporter komplett aufheben (2.10.4). Dieser Effekt ist wiederum unabhängig von den DNA-bindenden Eigenschaften des Gfi-1 Proteins. Es ist daher anzunehmen, daß Gfi-1 und Pias3 an der gleichen Stelle in den Stat3 Signalweg eingreifen. Nach den vorliegenden Daten ist das der Zeitpunkt nach der Phosphorylierung und Dimerisierung der Stat3 Proteine und deren Translokation in den Zellkern (siehe auch 2.8 und 2.9).

2.11 Gfi-1 verstärkt auch den Effekt von Interleukin 6 auf den c-fos Promotor

Ein weiteres Zielgen von Stat3 ist der c-fos Promotor (siehe 1.4). Die transkriptionelle Aktivierung des c-fos Gens durch Wachstumsfaktoren unterliegt einer komplexen Regulation bei der Stat3 eine wichtige Rolle spielt (Leaman et al., 1996, Hill et al., 1995). Da es Hinweise gibt, daß Gfi-1 die Zellzyklusprogression beschleunigen kann (Grimes et al., 1996, H. Karsunky, persönliche Mitteilung), wurde der Effekt von Gfi-1 auf einen Teil des c-fos Promotor, der die ersten 600 Nukleotide im 5'-Bereich der Initiationsstelle enthält (R. Müller, persönliche Mitteilung) nach Stimulation mit Interleukin 6 in HepG2 Zellen untersucht (Abb. 20 b). Der c-fos Promotor ließ sich allein durch Interleukin 6 nur 2,5 fach stimulieren (Abb. 20 a, Spalten 1 und 2). Im Vergleich dazu wurde die Stimulation des -Antichymotrypsinpromotors aufgetragen (Abb. 20 a, pACT, letzten beiden Spalten).

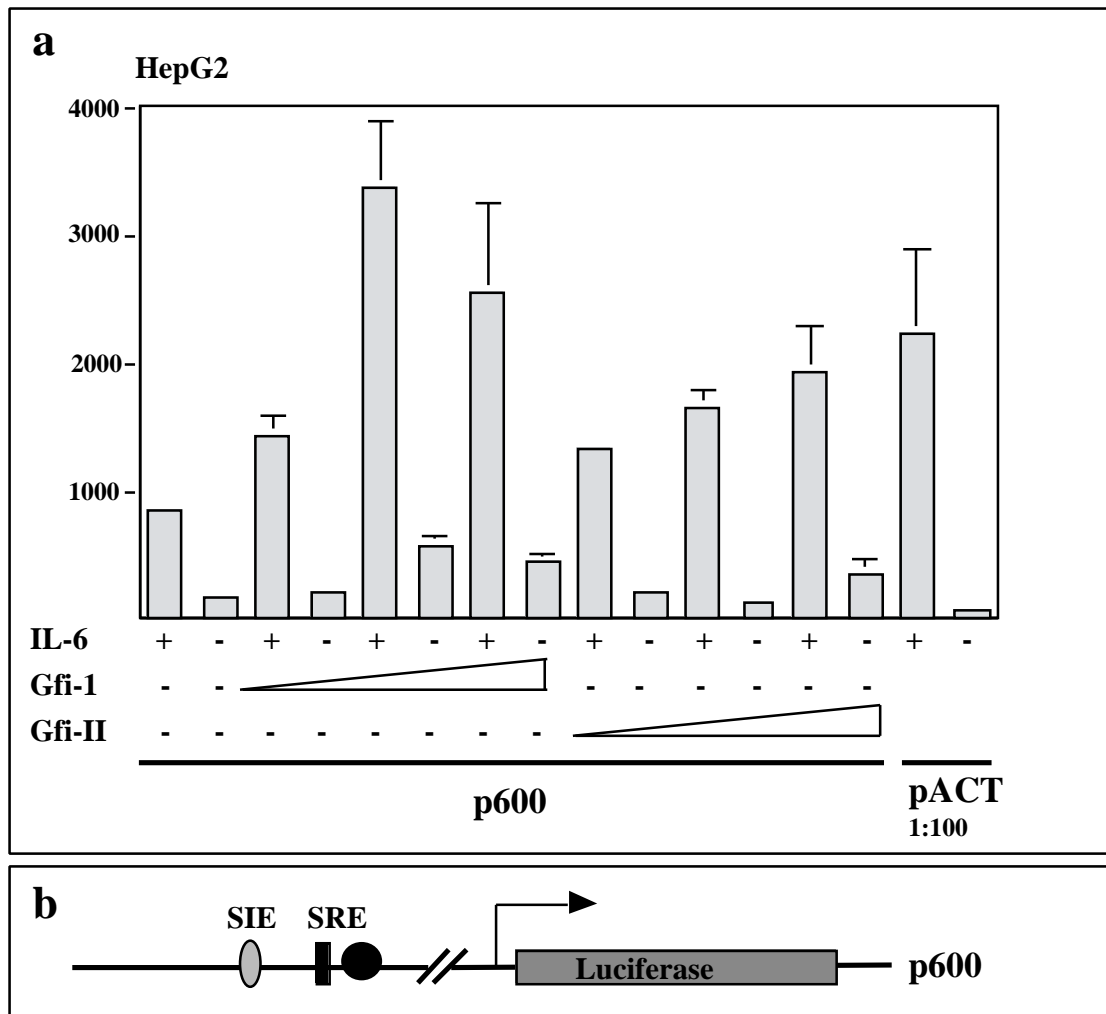


Abb. 21: Messung der Stat3 Aktivität mit dem c-fos Promotor nach Kotransfektion von Gfi Expressionsplasmiden

a) Einfluß von steigenden Mengen an Gfi-1 und His Gfi-II Expressionsplasmid auf den Reporter mit dem c-fos Promotor (0,75 µg Reporter / 6 Werte, 0,75 µg Stat3 Expressionsplasmid / 6 Werte, Expressionsplasmid / 6 Werte, die Mengen an Gfi-1 und His Gfi-II Expressionsplasmid (0,5µg, 1,0 µg, 1,5 µg) beziehen sich auf 6 Werte)

b) Schematische Darstellung des c-fos Promotor Luciferase Konstruktes p600. Die Stat3 Bindestellen sind mit SIE (sis inducible element) bezeichnet. SRE bedeutet serum response element (Hill et al., 1995). Die Initiationsstelle der Transkription wird durch einen Pfeil angegeben.

Die Zugabe von steigenden Mengen an Gfi-1 Expressionsplasmid führte konzentrationsabhängig zu einer verstärkten Aktivierung des Promotors (Abb. 20 a, Spalten 3 - 8). Derselbe Effekt war zu beobachten, wenn die Mutante His Gfi-II verwendet worden ist (Abb. 20 a, Spalten 9 - 15). Dieses Experiment zeigte, daß Gfi-1 und His Gfi-II auch die Stat3 Wirkung auf den Promotor des "immediate early" Gens c-fos verstärken können. Diese Beobachtung stimmt auch mit publizierten Daten überein, wonach das Stat3 Signal alleine nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Promotors ausreicht (Hill et al., 1995).

3. Diskussion

3.1 Pias3 als Interaktionspartner von Gfi-1 und Verbindung zum Stat3 Signaltransduktionsweg

3.1.1 Die Interaktion *in-vitro* und *in-vivo*

Die unter 2 präsentierten Ergebnisse führen zu der Hypothese einer biochemischen und funktionellen Interaktion zwischen den Proteinen Gfi-1 und Pias3. Zur Unterstützung dieser Aussage sind eine Reihe von experimentellen Daten aufgeführt worden. Die Interaktion wurde zunächst *in-vivo* in Hefen mit Hilfe des „Two-Hybrid“ Systems gefunden und bestätigt (2.2). Sie konnte durch weitere Studien auf den Bereich des Gfi-1 Proteins außerhalb des Zinkfingers eingeschränkt werden (2.2). Auf Seiten von Pias3 reichte bereits der c-Terminus für eine Interaktion in Hefen aus, aber auch das gesamte Pias3 Protein interagiert mit Gfi-1 in Hefe (2.2), auch wenn Gfi-1 als VP-16 Fusionsprotein und Pias3 als LexA Fusionsprotein exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht bei allen in Hefe gefundenen Interaktionen der Fall. Im Gegensatz zur publizierten Stat1-Pias1 Interaktion ist die Interaktion zwischen Gfi-1 und dem gesamten Pias3 Protein ebenfalls meßbar (vergleiche Erklärung von Liu et al., 1998). Die Daten aus den Hefeexperimenten konnten durch Kontrollen bestätigt werden, bei denen einzelne Komponenten des „Two-Hybrid“ Systems über induzierbare Promotoren in der Hefe ein- oder ausgeschaltet wurden (Daten nicht gezeigt, zur Induktion von Hefevektoren siehe auch Rödel, 1995).

Die zentralen Aussagen über die Pias3-Gfi-1 Interaktion konnten auch durch biochemische Untersuchungen *in-vitro* und *in-vivo* unterstützt werden (2.6): Das Pias3 Protein konnte *in-vitro* in einem Komplex mit dem n-Terminus von Gfi-1 zusammen aufgereinigt werden, wobei die Bedingungen stringent genug waren, um die Detektion nicht spezifischer Interaktionen auszuschließen. *In-vivo* war die Aufreinigung eines Komplexes aus dem gesamten Gfi-1 Protein und Pias3 möglich. Die Präzipitation des Gfi-1 n-Terminus mit

Pias3 funktionierte im Vergleich dazu nicht (2.6). Möglicherweise sind die Bedingungen für eine Präzipitation *in-vivo* noch nicht optimal gewählt worden. Vielleicht zeigt aber auch die Verteilung von Gfi-II GFP und Pias3 in den Kolo-kalisationsexperimenten (2.8), daß beide *in-vivo* in einer Form vorliegen, die im Vergleich zu den Wildtyp Proteinen nicht physiologisch ist. Es ist denkbar, daß sich die Komplexe, die sich zum Kerntransport „aufstauen“, nicht für eine Kopräzipitation eignen. In Hefen war die Interaktion zwischen Gfi-II und Pias3 durchaus meßbar. In diesem System wird der Transport von beiden Interaktionspartnern in den Zellkern durch die Kernlokalisierungssequenzen im verwendeten LexA bzw. VP16 Anteil des Fusionsproteins garantiert (siehe Material und Methoden).

Neben den biochemischen Experimenten lieferten die zellbiologischen Lokalisationstudien sehr gute Hinweise auf eine Gfi-1-Pias3 Interaktion. Zuerst einmal waren beide Proteine im gleichen zellulären Kompartiment nämlich dem Zellkern lokalisiert (2.7). Zweitens war die Morphologie dieser Lokalisation in Form einer punktförmigen Verteilung über den Kern identisch, wenn auch bei Pias3 im Durchschnitt eine geringere Anzahl an punktförmigen Signalen zu finden war als bei Gfi-1 (eigene Beobachtung). Die Untersuchung dieser punktförmigen Verteilung zeigte darüberhinaus, daß beide Proteine bei einer Doppelfärbung in den gleichen Punkten im Zellkern vorliegen (2.8). Alle Aufnahmen sind mit einem konfokalem „Laser Scanning Mikroskop“ gemacht worden (siehe Material und Methoden), und repräsentieren Schnittebenen durch die betrachteten Zellen. Artefakte bei den Beobachtungen aufgrund von sich überlagernden Signalen aus verschiedenen Ebenen oder von einer nicht sauberen Trennung der beiden Fluoreszenzen sind daher ausgeschlossen (vergleiche auch Kontrollen in 2.8). Die Daten der Lokalisationstudien mit den Gfi-1 Mutanten unterstützen wiederum die Annahme, daß für eine Interaktion nur der n-Terminus von Gfi-1 notwendig ist (2.8). Die Interaktion zwischen Gfi-II GFP und Pias3 ist dabei so stark, daß sie ausreicht, die Kernlokalisierung von Pias3 in NIH 3T3 Zellen fast komplett aufzuheben. Die dabei entstandenen Aggregate im Zytoplasma konnten zwar nicht näher charakterisiert werden, ihre Morphologie läßt aber vermuten, daß es sich wohl eher um die Folgen eines intrazellulären Transportproblems handelt, als um Teile des Proteasomes (2.8). Die Tatsache, daß die intrazelluläre Lokalisation von Pias3 durch eine

Gfi-1 Mutante beeinflusst werden kann, von der man nach bisherigen Überlegungen auch eine Interaktion erwarten würde, liefert ein sehr starkes Argument für eine Gfi-1 Pias3 Interaktion *in-vivo*. Zumal der zweite bekannte Pias3 Interaktionspartner - tyrosinphosphoryliertes Stat3 Protein - die Pias3 Lokalisation überhaupt nicht beeinflusst (siehe unten). In 293 Zellen war ebenfalls eine Kolo-kalisation von beiden Proteinen zu sehen. Die Mutante Gfi-II GFP konnte jedoch nicht die Kernlokalisation von Pias3 aufheben. Offensichtlich funktionieren die Kerntransportmechanismen in 293 Zellen und NIH 3T3 Zellen unterschiedlich.

Da bekannt ist, daß Pias3 auf die Stat3 Signaltransduktion wirkt, die Transkription von Gfi-1 und Pias3 in T-Zellen nach Stimulation z. T. ähnlich reguliert wird (2.5), eine Gfi-1-Pias3 Interaktion *in-vivo* wahrscheinlich ist und Stat3 ebenso wie Gfi-1 in T-Zellen wirken kann, ist es zwingend, den Einfluß, den Gfi-1 und Pias3 zusammen auf die Stat3 Signaltransduktion haben, zu untersuchen. Die ersten funktionellen Daten in diesem Kontext lieferten Experimente, die die Aktivierung von Stat3 an Hand seiner Tyrosinphosphorylierung *in-vivo* durch indirekte Immunfluoreszenz untersuchten (2.9). Es zeigte sich, daß nach Stat3 Aktivierung in transfizierten Zellen das tyrosinphosphorylierte Stat3 Protein und das Pias3 Protein im Zellkern kolo-kalisieren. Zu späteren Zeitpunkten ist eine Aufenthaltsänderung des Phospho-Stat3 Proteins in der Zelle zu beobachten (2.9), die auf einen Transport aus dem Zellkern heraus hinweist. Da jede transfizierte Zelle anders auf die Stat3 Aktivierung reagiert, war jedoch kein einheitliches Muster zu verschiedenen Zeitpunkten zu beobachten. Um verlässliche Daten auf diesem Feld zu gewinnen, müßten entweder Zelllinien benutzt werden oder die Morphologie sehr vieler Zellen an einem Zeitpunkt beobachtet und klassifiziert werden. Entscheidend ist jedoch ein Vergleich mit der Verteilung von aktiviertem Stat3 Protein in Anwesenheit von Gfi-1. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten, daß durch Gfi-1 aktiviertes Stat3 Protein diffus im Kern verteilt ist und nicht in einzelnen Punkten vorliegt. Da über die Bedeutung der Verteilung von aktiven Transkriptionsfaktoren im Zellkern wenig bekannt ist (Misteli et al., 1998), läßt sich auch kein Rückschluß auf die funktionelle Bedeutung dieses Verteilungsunterschiedes ziehen. Auch ist in dieser Versuchsreihe eine Änderung der Stat3 Verteilung über die Zeit nach der Aktivierung nicht untersucht worden. Außerdem liegt möglicherweise in

den Gfi-1 transfizierten Zellen bereits eine Form von Voraktivierung des Stat3 Proteins vor. Inwiefern also Gfi-1 den zeitlichen Ablauf und die Kinetik der Stat3 Aktivierung beeinflusst ist noch nicht geklärt. Wesentlich ist jedoch, daß der Einfluß von Gfi-1 auf die Stat3 Signaltransduktion an Hand des Verteilungsmusters von aktiviertem Stat3 meßbar ist und somit auf eine funktionelle Konsequenz der Gfi-1-Pias3 Interaktion hinweist. Darüberhinaus konnte zum ersten Mal die Interaktion von Pias3 und aktiviertem Stat3 durch Immunfluoreszenz visuell dargestellt werden. Die Bilder bestätigen auch neuere Daten, wonach bei einer Stat3 Aktivierung nur ca. 30 % der phosphorylierten Stat3 Proteine tatsächlich im Zellkern sind (Ndubuisi et al., 1999).

Entscheidend für die Relevanz der Gfi-1-Pias3 Interaktion ist aber eine Wirkung auf Zielgene der Stat3 Signaltransduktion. Funktionelle Daten können daher vor allem durch die Untersuchung des Einflusses von Gfi-1 auf das Transaktivierungspotential von Stat3 Proteinen nach deren Aktivierung erhalten werden. Es zeigte sich, daß in Gegenwart von Gfi-1 ein spezifisch Stat3 abhängiger Promotor besser aktiviert werden kann (2.10). Der Effekt ist eindeutig auf eine Verstärkung des Stat3 Signalweges zurückzuführen, denn er tritt nur auf, wenn dieser durch Interleukin 6 Zugabe stimuliert wird und er ist unabhängig von der DNA-Bindung von Gfi-1. Diese Wirkung von Gfi-1 auf das Transaktivierungspotential von Stat3 ist genau gegensätzlich zu der von Pias3 (2.10, Chung et al, 1997). Darüberhinaus kann Gfi-1 diese Pias3 Wirkung vollständig aufheben, wiederum ohne selbst DNA binden zu können. (2.10). Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten aus den biochemischen und zellbiologischen Experimenten (2.1, 2.6, 2.7, 2.8), wonach für eine Interaktion von Gfi-1 und Pias3 der nicht DNA bindende Bereich von Gfi-1 verantwortlich ist. Das Modell, daß Gfi-1 den Stat3 Signalweg dadurch verstärkt, daß es mit Pias3 den Inhibitor des Signalweges bindet und „neutralisiert“, wird ebenfalls durch die mRNA Expressionsstudien bei T-Zellaktivierung gestützt (2.5), die ein gleichgerichtetes Verhalten der mRNA Expression beider Gene nach T-Zellaktivierung zeigten. Für einen Effekt von Gfi-1 auf die Stat3 Aktivierung sprechen zusätzlich noch die Immunfluoreszenzstudien aus 2.9, die zeigten das in Gegenwart von Gfi-1 aktiviertes Stat3 im Zellkern anders verteilt ist, als in Gegenwart von Pias3. Die bisherigen experimentellen Daten könnten in Zukunft noch

bestätigt werden, indem gezeigt wird, daß die Fähigkeit von Pias3 die Stat3 DNA-Bindung aufzuheben, durch die Anwesenheit von Gfi-1 blockiert wird (Chung et al., 1997).

3.1.2 Modell zum Einfluß von Gfi-1 und Pias3 auf die Stat3 Signaltransduktion

Aufgrund aller hier vorliegenden Ergebnisse wird folgendes Modell vorgeschlagen (Abb. 22). Aktivierte Stat3 Proteine können im Zellkern durch Bindung von Pias3 deaktiviert werden und wirken nicht mehr als transkriptionelle Transaktivatoren (siehe Chung et al., 1997, Liu et al., 1998, Heinrich et al., 1998, Shuai, 1999, siehe 2.7, 2.9). Gfi-1 kann mit der n-terminalen Domäne Pias3 binden (siehe 2.1, 2.6, 2.8, 2.10) und damit deaktivieren. Durch den Gfi-Pias3 Komplex ist eine Pias3-Stat3 Bindung nicht mehr möglich und die Deaktivierung der Stat3 Proteine unterbleibt (siehe 2.9.). Folglich ist die Stat3 Signaltransduktion durch das Fehlen der Hemmung durch Pias3 verstärkt (siehe 2.10). Dieses Modell kann auf zwei verschiedenen Wirkungsmechanismen beruhen.

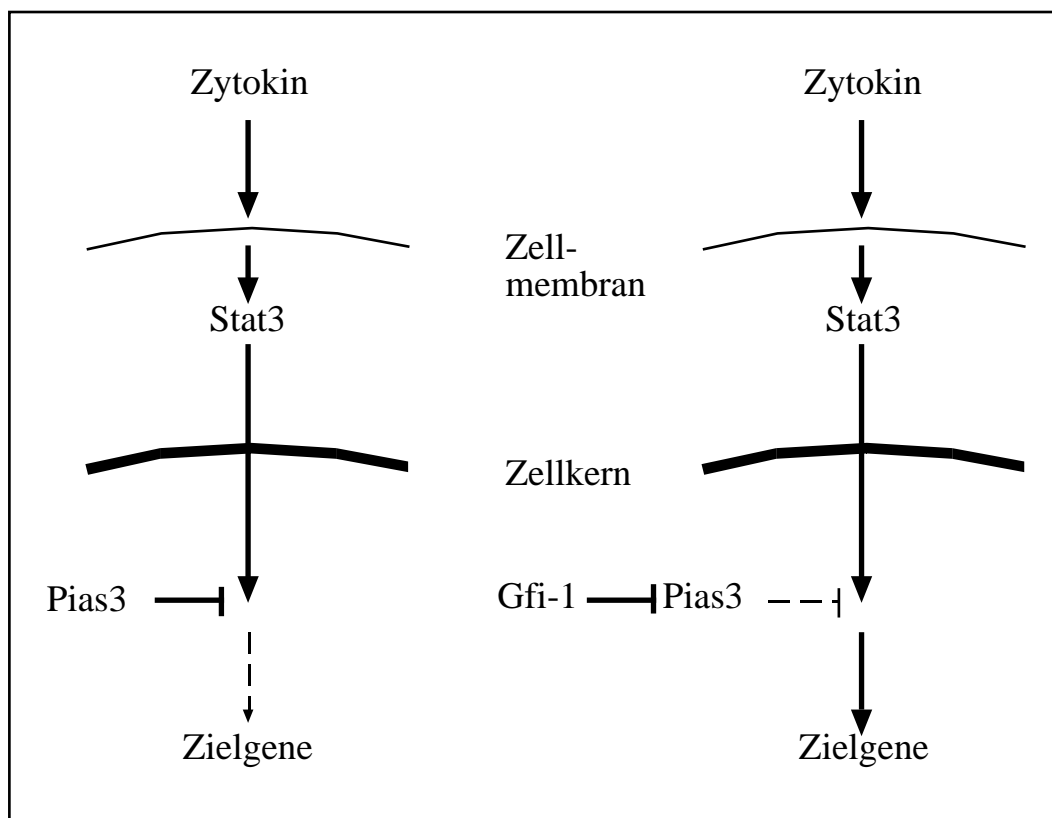


Abb. 22: Modell zum Einfluß von Gfi-1 und Pias3 auf das Stat3 Protein

3.1.2.1 Das Modell einer direkten Interaktion von Pias3 und Gfi-1

Naheliegend ist zunächst ein Modell der direkten Interaktion. Gfi-1 und Pias3 assoziieren im Zellkern, wobei der c-Terminus von Pias3 den n-Terminus von Gfi-1 binden kann. Durch diese Bindung kann Pias3 aktiviertes Stat3 nicht mehr binden und inhibieren. Deshalb liegt in der Zelle mehr aktiviertes Stat3 Protein vor. Es gibt Hinweise, daß für eine STAT-PIAS Bindung im Falle der Kombination Pias1 und Stat1 eine Konformationsänderung von Pias1 notwendig ist (Liu et al., 1998). Deshalb ist es sehr gut vorstellbar, daß die Bindung eines anderen Proteins die PIAS-STAT Interaktion verhindern kann. Die Experimente zu der intrazellulären Lokalisation von aktiviertem Stat3 weisen darauf hin, daß es keinen ternären Komplex aus Gfi-1, Pias3 und Stat3 *in-vivo* gibt (vergleiche 2.9). Allerdings gibt es für eine direkte Interaktion keinen endgültigen Beweis, weil bei den Interaktionsstudien zwar Gfi-1 nicht aber Pias3 in gereinigter rekombinanter Form eingesetzt werden konnte. (vergleiche 2.2, 2.6, 2.8, 2.10). Da jedoch die Interaktion zwischen Gfi-1 und Pias3 auf mehrere Arten in verschiedenen experimentellen Systemen gemessen werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, daß beide Proteine direkt aneinander binden. Im anderen Fall müßte man die Anwesenheit eines dritten Bindungspartners, der als Brücke fungiert, sowohl in Hefe, als auch in Säugerzellen, als auch in Reticulozytenextrakt postulieren. Da zumindest in Hefe kein Protein mit starker Homologie zu Pias3 bzw. Pias1 gefunden werden konnte (eigene Beobachtung), ist es auch unwahrscheinlich, daß in Hefen ein solches Brückenprotein existieren sollte. Die Annahme einer direkten Pias3-Gfi-1 Interaktion wird dadurch gestützt, daß die experimentellen Ergebnisse den Ausschluß der Alternative nahelegen.

3.1.2.2 Das Modell einer indirekten Interaktion von Pias3 und Gfi-1

Obwohl es Gründe gibt, eine direkte Interaktion zu favorisieren (siehe 3.1.2.1) kann die Möglichkeit einer indirekten Interaktion nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist vorstellbar, daß entweder ein Brückenprotein existiert (siehe 3.1.2.1) oder einer der Interaktionspartner durch kovalente Modifikation verändert wird und der andere an die

Modifikation bindet. Solche Überlegungen existieren z. B. für die Interaktion von Ubc9 mit einigen potentiellen Partnern. Da Ubc9 im „Two-Hybrid“ System häufig als Interaktionspartner identifiziert wird und selten eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion nachgewiesen werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, daß die potentiellen Interaktionspartner in Hefe kovalent durch das Anhängen eines Ubiquitin ähnlichen Proteins modifiziert werden. Diese Modifikation könnte dann von Ubc9 als Pseudosubstrat gebunden werden und fälschlicherweise als direkte Proteininteraktion interpretiert werden (Gong et al., 1997). Ähnliche Vorgänge lassen sich auch in Säugerzellen vorstellen. Da aber für die Pias3-Gfi-1 Interaktion eine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte (2.9, 2.10), ist es unwahrscheinlich, daß es sich in diesem Fall um eine Fehlinterpretation rein biochemischer Daten handelt. Bei der Gesamtbetrachtung aller experimentellen Daten verdichten sich also die Hinweise, daß das Modell einer direkten Interaktion von Gfi-1 und Pias3 korrekt ist.

3.1.3 Die Bedeutung der Gfi-1 Pias3 Interaktion für die Gfi-1 Funktion

Alle Experimente zu Gfi-1 und Pias3 haben sich auf den Einfluß von Gfi-1 auf die Pias3 Funktion, d. h. letztendlich auf die Modulation des Stat3 Signaltransduktionsweges konzentriert. Es ist wahrscheinlich, daß Gfi-1 außer der Pias3 Bindung auch noch andere Funktionen in der Zelle hat (siehe Grimes et al., 1996). Diese Funktionen können durch die Pias3 Bindung ebenfalls betroffen sein. Aus mehreren Gründen sind aber bis jetzt keine Experimente unternommen worden um diese Frage zu klären. Bei der Untersuchung der Gfi-1 Funktion war es zunächst wichtig, Gfi-1 in ein bereits bekanntes Signaltransduktionschema einzuordnen (vergleiche 1.2, 1.5, 1.6). Da die Stat3 Signaltransduktion schon gut charakterisiert ist, und Pias3 offensichtlich eine Brücke zwischen diesem Weg und Gfi-1 bildet, konzentrierten sich die Experimente auf die Verbindung von Gfi-1 über Pias3 zu Stat3. Ein weiterer Grund ist, daß die Funktion von Gfi-1 als transkriptioneller Repressor nicht sehr gut untersucht ist. Es sind keine Zielgene bekannt, die durch Gfi-1 gut reprimiert werden können (vergleiche 1.5). Zum Bax-Promotor und zum CMV Promotor existieren widersprüchliche Daten (Grimes et al., 1996, Schmidt et al., 1999, eigene Beobachtung).

Eine Untersuchung der Pias3 Wirkung auf die Gfi-1 Funktion scheitert allein daran, daß bisher kein gutes experimentelles System *in-vivo* für die Untersuchung der Funktion von Gfi-1 als transkriptioneller Repressor existiert. Sobald entsprechende Zielgene identifiziert worden sind, kann in diesem Zusammenhang auch die Wirkung von Pias3 untersucht werden (siehe auch 3.1.4)

3.1.4 Funktionen von Pias3 außerhalb des Stat3 Signalweges

Über eine Funktion von Pias3 außerhalb des Stat3 Signalweges ist nichts bekannt und es kann daher nur darüber spekuliert werden. Da das Pias3 Homolog Miz1 in Verbindung mit seinem Interaktionspartner Msx2 DNA binden kann (Wu et al., 1997), ist es möglich, daß auch Pias3 mit oder ohne Gfi-1 DNA binden kann. Der entsprechende Proteinabschnitt im Bereich des Zinkfingers ist fast vollständig konserviert (2.4) und die Identifizierung von mindestens 6 verschiedenen Genen dreier Spezies (Ratte, Maus, Mensch) lassen vermuten, daß es sich bei dem in Abb. 8 b dargestellten Homologiebereich um eine hochkonservierte Proteindomäne noch unbekannter Funktion handelt. Der publizierte Interaktionspartner von Pias1, das Gu binding Protein (2.4), ist eine RNA Helikase (Valdez et al., 1997). RNA Helikasen können im Komplex mit anderen Proteinen RNA Polymerase II binden und bei der transkriptionellen Aktivierung bestimmter Promotoren eine Rolle spielen (Nakajima et al., 1997). Das Rattenprotein ARIP3 ist ein transkriptioneller Koregulator des Androgenrezeptors (Moilanen et al., 1998). Es ist also durchaus vorstellbar, daß die Familie der PIAS-Proteine noch andere Funktionen innerhalb der Zelle hat.

3.2 Der Stat3 Signalweg und die beschriebenen Wirkung von Gfi-1 auf die Zellphysiologie

Das in 3.1.2 vorgeschlagene und diskutierte Modell von Gfi-1 als einem Verstärker der Stat3 Signaltransduktion durch die Bindung von Pias3 sollte in der Lage sein, die bisher publizierten Eigenschaften von Gfi-1 zu erklären. Im wesentlichen sind das die drei Punkte Interleukin 2 unabhängiges Wachstum, Beschleunigung des G1/S Überganges im Zellzyklus

und Tumorprogression in der Lymphomagenese (vergleiche 1.5). Nachfolgend soll versucht werden anhand des vorgeschlagenen Modells die Punkte separat zu diskutieren, wobei sicherlich Punkt 2 und 3 eng miteinander zusammenhängen.

3.2.1 Indirekter Effekt von Stat3 auf die Interleukin 2 Signaltransduktion

Die Interleukin 2 Signaltransduktion läuft ebenso wie die Interleukin 6 Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren und den JAK / STAT Signalweg (siehe 1.2 und 1.4, zur Übersicht: Gesebert et al., 1998). Das beteiligte STAT-Protein ist im Gegensatz zum Interleukin 6 Signalweg im wesentlichen nicht Stat3, sondern hauptsächlich Stat5 (Gilmour et al., 1995, Gaffen et al., 1995). Es gibt auch Hinweise, daß durch Interleukin 2 Stat3 aktiviert werden kann (Nielsen et al., 1994, Frank et al., 1995, Gerwien et al., 1999). Die Ergebnisse von Experimenten mit Mäusen, in denen die Stat5a und Stat5b Gene gezielt inaktiviert worden sind, lassen darauf schließen, daß Interleukin 2 hauptsächlich die Phosphorylierung von Stat5 und nicht von Stat3 hervorruft, denn der Phänotyp der Stat5^{-/-} Mäuse ähnelt dem Phänotyp von Mauslinien, in denen der Interleukin-2-Rezeptor defekt ist (Teglund et al., 1998, Morrigl et al., 1999).

Gfi-1 ist ursprünglich als Gen identifiziert worden, dessen Produkt eine Interleukin 2 abhängige Zelllinie teilweise Interleukin 2 unabhängig wachsen läßt (Gilks et al., 1993). Ektopische Expression von Gfi-1 reduziert die Apoptose bei CTLL Zellen nach Entzug von Interleukin 2 (Zörnig et al., 1996). Transiente Transfektion von Gfi-1 in Kit472 Zellen erhöht die Aktivität eines Stat5 abhängigen artifiziellen Promotors nach Interleukin 2 Zugabe (T. Schmidt, persönliche Mitteilung). Drei unabhängige Experimente ordnen Gfi-1 als Verstärker des Interleukin 2 Signalweges in peripheren T-Lymphozyten ein. Es ist jedoch nicht klar, ob Gfi-1 einen direkten oder indirekten Einfluß auf diesen Signalweg hat. Eine Möglichkeit wäre, daß Gfi-1 über Pias3 auch die Stat5 Aktivität regulieren kann. Pias3 hat nach bisherigen Erkenntnissen jedoch keinen direkten Einfluß auf die Stat5 Aktivität (eigene Beobachtung). Eine weitere Möglichkeit wäre die Existenz eines „Pias5“ Proteins, welches analog zu Pias1 und Pias3 die Stat5 Aktivität hemmt und seinerseits durch Gfi-1

gebunden werden kann. Da die bisher bekannten PIAS-Proteine sehr homolog sind (siehe 2.4), liegt dies durchaus im Bereich des Möglichen. Die dritte Möglichkeit ist, daß Stat3 in irgendeiner Form die Interleukin 2 Signaltransduktion verstärkt. Vielleicht leistet Stat3 tatsächlich unmittelbar einen bisher vernachlässigten Beitrag zur Interleukin 2 Signaltransduktion oder es liegt ein mittelbarer, indirekter Einfluß von Stat3 vor. Einen Hinweis auf einen indirekten Effekt geben lck Gfi-1 transgene Mäuse, in denen unter nicht genauer charakterisierten Umständen auf der Zelloberfläche der Thymozyten eine höhere Konzentration der Interleukin-2-Rezeptor α -Kette (CD25) vorhanden ist (Schmidt et al., 1998, H. Karsunky, persönliche Mitteilung). Dieser Anteil des heterotrimeren Interleukin-2-Rezeptors (siehe 1.4) ist kritisch für die Bildung des hochaffinen Rezeptorkomplexes und unterliegt einer transkriptionellen Regulation im humanen und murinen Immunsystem (John et al., 1996, Sperisen et al., 1995).

Ein gezieltes Ausschalten des Stat3 Gens in Mäusen ist embryonal letal (Takeda et al., 1997), jedoch kann durch das "Cre-Lox" System ein Gen nur in bestimmten Organen gezielt ausgeschaltet werden (Rajewsky et al., 1996). Ein Ausschalten von Stat3 in T-Zellen führt zu einer verstärkten T-Zellproliferation durch die Unterdrückung der Apoptose (Takeda et al., 1998). Interessanterweise exprimieren die T-Zellen, die Stat3^{-/-} sind, auf ihrer Oberfläche weniger Interleukin-2-Rezeptor α -Kette (CD25) und können nur durch unphysiologisch hohe Konzentrationen von Interleukin 2 *in-vitro* zur Proliferation angeregt werden (Akaishi et al., 1998). Der murine Promotor der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors enthält potentielle Bindestellen für Stat3 (eigene Beobachtung), welche Stat3 *in-vitro* binden können (Gerwien et al., 1999). Der Promotor wird durch Stat3 alleine jedoch nur sehr schwach aktiviert (eigene Beobachtung). Da bekannt ist, daß der Promotor einer komplexen Regulation unterliegt, zu der u. a. die Transkriptionsfaktoren Stat5, Elf-1, HMG-I(Y), NF κ B und Vertreter der GATA-Familie beitragen (Sperisen et al., 1995, Serdobova et al., 1997, John et al., 1996, Algarte et al., 1995), ist es durchaus möglich, daß Stat3 nur in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren den CD25 Promotor aktivieren kann. Es ist bereits gezeigt worden, daß für eine vollständige Aktivierung des Promotors durch STAT-Proteine ein vorheriges Binden von NF κ B notwendig ist (Sperisen et al.,

1995). Ein wichtiges zukünftiges Experiment, um die Wirkung von Gfi-1 auf die Interleukin 2 Signaltransduktion zu klären, ist daher die Untersuchung des CD25 Promotors auf Aktivierbarkeit durch Stat3. Falls Stat3 zur Aktivierung des Promotors beitragen kann, ist es vorstellbar, daß Gfi-1 durch Verstärkung des Stat3 Signalweges die Aktivierung der CD25-Expression erleichtert und die T-Zellen damit leichter in die Phase der auto- und parakrinen Stimulation durch Interleukin 2 kommen (Sperisen et al., 1995, Saparov et al., 1999). Hiermit wäre ein Modell vorhanden, das erklärt, wie die ektopische Expression von Gfi-1 bei T-Zellen zu relativer Interleukin 2 Unabhängigkeit führt.

3.2.2 Einfluß von Gfi-1 auf die Zellzyklusprogression über verstärkte Stat3 Aktivierung

Gfi-1 kann durch ektopische Expression den Zellzyklusarrest einer Interleukin 2 abhängigen Zelllinie verhindern (Grimes et al., 1996). T-Zellen von CD2 Gfi-1 transgenen Mäusen proliferieren nach Wachstumsstimulation stärker als T-Zellen aus Wildtyp Mäusen (H. Karsunky, persönliche Mitteilung). Die Expression von Gfi-1 wird in peripheren T-Zellen nach Stimulation mit TPA oder ConA mit einer ähnlichen Kinetik induziert, wie die Expression von „immediate-early“ Genen (siehe 2.5, H. Karsunky, persönliche Mitteilung). Gfi-1B, ein Gfi-1 Homolog, das die gleiche DNA-Sequenz binden kann, reprimiert den Zellzyklusinhibitor p21 (Tong et al., 1998, siehe auch 1.5). Es ist daher anzunehmen, daß Gfi-1 den Zellzyklus beeinflussen und T-Zellen generell zur Proliferation anregen kann. Eine Möglichkeit diese Effekte indirekt zu erklären, wäre die unter 3.2.2 schon angesprochene Verstärkung des Interleukin 2 Signals (Morrigl et al., 1999). Es ist jedoch auch möglich, daß Gfi-1 direkter auf die Zellzyklusprogression wirkt, indem es das Stat3 Signal verstärkt.

Zu den Zielgenen von Stat3 gehören neben den APP Genen (siehe 1.4) auch die beiden „immediate-early“ Gene c-fos und junB (siehe 1.4). Tatsächlich wurde im c-fos Promotor das regulatorische Element SIE (sis inducible element) entdeckt, an das durch Wachstumsfaktoren die Bindung eines Proteinkomplexes induziert werden kann (Hayes et al., 1987). Dieser Proteinkomplex wurde schließlich als aus STAT-Proteinen bestehend

identifiziert (Sadowski et al., 1993, Zhang et al., 1993). Spätere Studien am Fos-Promotor haben die Bedeutung der STAT-Proteine und insbesondere von Stat3 für die Induktion der c-Fos Expression herausgearbeitet (Leaman et al., 1996, Hill et al., 1995). Im Zusammenspiel mit der Hochregulation der JunB Expression führt die Stat3 Aktivierung nach Interleukin 6 Zugabe dann zur Bildung des AP-1 Komplexes (siehe 1.2, Solis-Herruzo et al., 1999, zur Bedeutung des AP-1 Komplexes für die Zellzyklusinduktion siehe Müller et al., 1993). Tatsächlich kann der Fos-Promotor in transienten Transfektionen in HepG2 Zellen durch Aktivierung von Stat3 nach Interleukin 6 Zugabe ungefähr 2,5 fach induziert werden (2.11). Diese Induktion kann durch Kotransfektion von Gfi-1 verdoppelt werden (2.11). Zwar sprechen die Expressionsstudien zu Gfi-1 und c-Fos eher dafür, daß c-Fos etwas früher induziert wird als Gfi-1 (siehe 2.5), jedoch ist die Bedeutung von Stat3 für die c-Fos Regulation abhängig von einem Stimulus durch Wachstumsfaktoren. Im Falle einer Stimulation durch TPA spielt Stat3 keine Rolle (Hill et al., 1995). Neben den „immediate-early“ Genen c-fos und junB kann Stat3 noch die Expression einer Reihe von Genen hochregulieren, die für die Zellzyklusprogression wichtig sind, bzw. die Expression anderer Gene, die sie hemmen, herunterregulieren (Fukada et al., 1998). Eine Verstärkung der Stat3 Signaltransduktion durch Gfi-1 könnte also den Eintritt in den Zellzyklus und das Durchlaufen desselbigen beschleunigen.

Stat3 kann auch noch auf eine weitere Art in die T-Zellproliferation eingreifen, indem es die Apoptose nach Interleukin 6 induzierter Proliferation in T-Zellen inhibiert (Takeda et al., 1998). Stat3 kann vermutlich direkt die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L (Catlett-Falcone et al., 1999, zur Familie der Bcl-2 Gene siehe Möröy et al., 1996) erhöhen; dieser Effekt ist auch in anderen Zellen beobachtet worden (Chen et al, 1999) und könnte durch Gfi-1 Expression verstärkt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Stat3 Aktivierung auf verschiedenen Wegen eine Beschleunigung der Zellzyklusprogression bewirkt. Eine Verstärkung der Stat3 Aktivierung hätte damit wohl auch eine verstärkte Zellzyklusprogression zur Folge. Im Falle des „immediate-early“ Genes c-fos konnte ein indirekter Einfluß von Gfi-1 auf den c-Fos Promotor über Stat3 schon nachgewiesen werden.

3.2.3 Gfi-1 und Stat3 als Onkogene

Gfi-1 ist u. a. als Proto-onkogen, daß mit L-myc und Pim-1 in doppeltransgenen Mäusen kooperiert, gefunden worden (Zörnig et al., 1996). Sein onkogenes Potential konnte durch lack Gfi-1 transgene Mäuse und deren Kreuzung mit weiteren transgenen Mauslinien bestätigt werden (Schmidt et al., 1998a) und ist im Bezug auf seine Bedeutung für die Entwicklung und Transformation von T-Zellen intensiv untersucht worden (Schmidt, 1998b). Das humane Gfi-1 Gen liegt proximal in der Nähe eines chromosomalen Bruchpunktes in Neuroblastomen (Roberts et al., 1997). Das Homolog Gfi-1B hat vermutlich eine ähnliche onkogene Wirkung (Tong et al., 1998) und wird sowohl in Zelllinien, die sich von myeloischen Leukämien ableiten, als auch im peripheren Blut von CML Patienten exprimiert (Roedel et al., 1999).

Für das Stat3 Protein konnte kürzlich direkt nachgewiesen werden, daß es als konstitutiv aktive Form zu einer malignen Transformation von Fibroblasten beitragen kann (Bromberg et al., 1999). Stat3 transformierte Fibroblasten können nach Injektion in Nacktmäuse Tumore hervorrufen (Bromberg et al., 1999). Es war bereits vorher bekannt, daß eine Stat3 Aktivierung für eine onkogene Transformation wichtig ist (Yu et al., 1995, Bromberg et al., 1998, Besser et al., 1999, siehe auch 1.4). Auch in humanen Tumoren findet man aktiviertes Stat3 (Garcia et al., 1998).

Beide Proteine sind demnach mit der onkogenen Transformation von Zellen bereits in Verbindung gebracht worden. Sie besitzen ein nicht zu unterschätzendes onkogenes Potential. Konkrete Hinweise auf ihre Effekte bei der Kooperation mit weiteren Onkogenen und auf ihren Beitrag bei der malignen Transformation liefern die Überlegungen in 3.2.1 und 3.2.2. Denn sowohl die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, wie auch ein fehlregulierter Eintritt in den Zellzyklus sind für eine Tumorgenese wesentlich (Vogelstein et al., 1993). Das Modell einer Aktivierung des Stat3 Signalweges durch Gfi-1 über eine Interaktion mit Pias3, könnte die onkogene Wirkung von Gfi-1 durch das onkogene Potential von Stat3 erklären. Die Wirkung von Gfi-1 über Pias3 auf den Stat3 Signalweg ist biochemisch und funktionell gut dokumentiert, scheint aber als einzige mögliche Erklärung

für die Gfi-1 Wirkung zu wenig. Zum einen fehlt bis jetzt der direkte Beweis durch die Untersuchung der Stat3 Aktivierung in den murinen Tumoren, die Gfi-1 überexprimieren, zum anderen werden dann die Effekte von Gfi-1 auf die Transkription seiner Zielgenen komplett vernachlässigt (vergleiche auch Grimes et al., 1996). Weiterhin ist über den Effekt von konstitutiv aktivem Stat3 in transgenen Mausmodellen nichts bekannt, so daß ein Studium der Onkogenkooperation von Stat3 mit Kooperationspartnern von Gfi-1 wie L-myc und Pim-1 noch aussteht. Durch diese Versuche könnte man feststellen, ob Stat3 Gfi-1 in der Onkogenkooperation substituieren kann und somit Gfi-1 mit Stat3 und dessen Zielgenen einer Komplementaritätsgruppe zugeordnet werden können.

Die Ergebnisse der Suche nach Interaktionspartnern von Gfi-1 haben zu einer Einordnung von Gfi-1 in das Umfeld der Stat3 Signaltransduktion geführt und ermöglichen es, den Effekt von Gfi-1 auf den Zellzyklus recht gut zu erklären. Andere Gfi-1 Eigenschaften, wie die Fähigkeit ein Interleukin 2 unabhängiges Wachstum zu erzeugen, konnten noch nicht abschließend geklärt werden, obwohl auch dafür mehrere Erklärungsansätze entwickelt wurden (vergleiche 3.2.2). Ebenfalls konnten erste Hinweise für die Wirkung von Gfi-1 in der Lymphomagenese gegeben werden (3.2.3). Wiewohl die in dieser Arbeit vorgestellten Daten einen Einblick in die Funktion des Proto-Onkogens Gfi-1 erlauben und einen neuen Regulationsmechanismus innerhalb der Stat3 Signaltransduktion aufzeigen, können sie doch nicht alle anfangs aufgeworfenen Fragen erschöpfend beantworten. Vielmehr tauchen wiederum neue Fragen auf. Eine endgültige Klärung der Gfi-1 Funktion werden erst weitere Experimente liefern. Insgesamt gesehen ist es auch fraglich, ob ein so komplexes Netzwerk, wie es die Signaltransduktion darstellt, letztendlich überhaupt über die Untersuchung einzelner Komponenten begriffen werden kann. Vielleicht bleibt in diesem Fall „unser Wissen [] Stückwerk“ (Paulus).

4. Zusammenfassung

Die Isolierung von Interaktionspartnern des Zinkfingerproteins Gfi-1 führte zur Entdeckung eines unbekannten Genabschnittes, der sich als c-Terminus des Proteins Pias3 herausstellte. Pias3 ist als spezifischer Inhibitor der Stat3 Signaltransduktion charakterisiert worden und wirkt, indem es phosphoryliertes Stat3 Protein bindet und auf diese Weise eine DNA-Bindung von Stat3 und damit auch eine Transaktivierung von Stat3 Zielgenen verhindert. Im Laufe der Arbeit konnte gezeigt werden, daß für die Gfi-1-Pias3 Interaktion im Hefe „Two-Hybrid“ System und *in-vitro* der Bereich von Gfi-1 außerhalb des Zinkfingers ausreichend ist. Für eine Interaktion *in-vivo* ist das gesamte Gfi-1 Protein notwendig. Durch Immunfluoreszenzexperimente konnte eine Kolokalisation von Gfi-1 und Pias3 im Zellkern nachgewiesen werden, und es konnte ferner gezeigt werden, daß u. U. für die Kolokalisation der Gfi-1 Bereich außerhalb des Zinkfingers ausreicht. Die Untersuchung der Aktivierung von Stat3 in Gegenwart von Pias3 bzw. Gfi-1 durch weitere Immunfluoreszenzexperimente zeigte, daß Pias3 mit dem Stat3 Protein unmittelbar nach dessen Aktivierung im Zellkern kolokalisiert. Diese Kolokalisation nimmt jedoch im Laufe des Abflauens der Stat3 Aktivierung ab. Das Verteilungsmuster von aktivierten Stat3 Protein in Gegenwart von Pias3 unterscheidet sich von dem Verteilungsmuster in Gegenwart von Gfi-1. Weder die Verteilung von Gfi-1 noch die von Pias3 wird jedoch durch eine Stat3 Aktivierung beeinflusst. Experimente mit einem ausschließlich durch Stat3 transaktivierbaren Promotor ergaben, daß Gfi-1 die Aktivierung des Promotors durch den Wachstumsfaktor Interleukin 6 verstärken kann. Diese Verstärkung trat auch ein, wenn eine Gfi-1 Mutante verwendet wurde, der der Zinkfinger fehlte. Darüberhinaus konnten Gfi-1 und diese Mutante die Hemmung des Promotors durch Pias3 nach Interleukin 6 Stimulation vollständig aufheben. Abschließende Untersuchungen des auch durch Stat3 transaktivierbaren c-Fos Promotors zeigten ebenfalls, daß Gfi-1 und die Gfi-1 Mutante die Aktivierung über Interleukin 6 verstärken konnten. Alle Experimente zur Gfi-1-Pias3 Interaktion führten dann zu dem Modell, wonach der Bereich von Gfi-1 außerhalb des Zinkfingers mit dem c-Terminus von Pias3 interagiert und dadurch die Hemmung der Stat3 Signaltransduktion durch Pias3 aufheben kann.

5. Material und Methoden

5.1 Lösungen

Acrylamidlösung:	38% w/v	Acrylamid
	2% w/v	N,N'-Methylenbisacrylamid
100x Denhardts:	2% w/v	Ficoll 400
	2% w/v	BSA
	2% w/v	Polyvinylpyrrolidon
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml	Ethidiumbromid in TE
Puffer P1:	10 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2:	0,2 M	NaOH
	1% w/v	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5 mit Essigsäure einstellen
50x MOPS:	1 M	MOPS
	250 mM	Natriumacetat
	5 mM	EDTA
10x PBS:	1,3 M	NaCl
	0,07 M	NaH ₂ PO ₄
	0,03 M	Na ₂ HPO ₄
5x Probenpuffer:	20% w/v	Ficoll 400

5. Material und Methoden

	0,025%	w/v	Bromphenolblau
	0,025%	w/v	Xylencyanol
	100	mM	EDTA
2x SDS-Probenpuffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 6,8
	3%	w/v	SDS
	15%	v/v	Glycerin
	100	mM	DTT
	0,025%	w/v	Bromphenolblau
20x SSC:	3	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
STE:	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl
	1	mM	EDTA ,pH 8,0 mit HCl einstellen
TAE:	40	mM	Tris-Acetat, pH 7,8
	2	mM	EDTA
TE:	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA
TBE:	90	mM	Tris-Borat, pH 8,3
	2	mM	EDTA
Prähybridisierungslösung: (Southern Blot)	2x	SSC	
	1%	w/v	SDS
	0,5%	w/v	Magermilchpulver
	0,75	mg/ml	denaturierte Heringssperma DNA

5. Material und Methoden

Hybridisierungslösung:	2x	SSC	
(Southern Blot)	1%	w/v	SDS
	0,5%	w/v	Magermilchpulver
	0,5	mg/ml	denaturierte Heringssperma DNA
	10%	w/v	Dextransulfat
Denaturierungspuffer:	1,65x		MOPS
(Northern Blot)	19%	v/v	Formamid
	20%	v/v	Formaldehyd
RNA-Probenpuffer:	30%	v/v	Glycerin
(Northern Blot)	0,25%	w/v	Xylencyanol
	0,25%	w/v	Bromphenolblau
Gelsystem:	1x		MOPS
(Northern Blot)	2,2	M	Formaldehyd
	1%	w/v	Agarose
Hybridisierungslösung:	7%	w/v	SDS
(Northern Blot)	1%	w/v	BSA
	15%	v/v	Formamid
	0,2	M	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2
	2	mM	EDTA
	1ml		denaturierte Heringssperma DNA (10 mg/ml)
	ad 100 ml (DEPC-H ₂ O)		
Proteaseinhibitoren	0,2	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	0,7	µg/ml	Pepstatin
	1	µg/ml	Leupeptin
	0,1%	w/v	Aprotenin
	1	mM	DTT

5.2 Medien

5.2.1 Bakterienmedien

Ampicillin	80 mg/ml	Endkonzentration 80 µg/ml (Merck)
Kanamycin	25 mg/ml	Endkonzentration 25 µg/ml (Sigma)
LB-Medium:	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Casein-Hydrolysat
	5 g/l	Hefe-Extrakt
		pH 7,2 mit NaOH einstellen
LB-Agar:	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium

5.2.2 Hefemedien

5.2.2.1 Vollmedien

YPD:	10 g/l	Yeast extract
	20 g/l	Peptone
	ad 900 ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	100 ml	20% Glucoselösung (separat autoklaviert)

5. Material und Methoden

4x YPD:	40	g/l	Yeast extract
	80	g/l	Peptone
	ad 900	ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	100	ml	80% Glucoselösung (separat autoklaviert)
Einfriermedium:	100	ml	4x YPD
(2x YPD /50% Glycerol)	100	ml	Glycerin (autoklaviert)
YPAD:	10	g/l	Yeast extract
	20	g/l	Peptone
	ad 900	ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	100	ml	20% Glucoselösung (separat autoklaviert)
	10	ml	L-Adeninlösung (500 mg/100 ml)

5.2.2.2 Mangelmedien

YC:	20	g/l	Glucose
bei Platten	18	g/l	Agar (Difco)
	ad 900	ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	10	g/l	Bernsteinsäure (Succinat)
	6	g/l	NaOH
	ad 50	ml	Millipore Wasser und durch 0.2µ Filter sterilisieren
	1,7	g/l	Yeast nitrogen base (Difco)
	5	g/l	Ammoniumsulfat
	20	ml	Aminosäuremix
	x	ml	Selektive Aminosäuren
	ad 50	ml	Millipore Wasser und durch 0.2µ Filter sterilisieren

5. Material und Methoden

SD-Medium:	20	g/l	Glucose
bei Platten	18	g/l	Agar (Difco)
	ad 900	ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	1,7	g/l	Yeast nitrogen base (Difco)
	5	g/l	Ammoniumsulfat
	20	ml	Aminosäuremix
	x	ml	Selektive Aminosäuren
	ad 100	ml	Millipore Wasser und durch 0.2µ Filter sterilfiltriert
SR-Medium:	30	g/l	Raffinose
bei Platten	18	g/l	Agar (Difco)
	ad 900	ml	Millipore Wasser und autoklavieren
	1,7	g/l	Yeast nitrogen base (Difco)
	5	g/l	Ammoniumsulfat
	20	ml	Aminosäuremix
	x	ml	Selektive Aminosäuren
	ad 100	ml	Millipore Wasser und durch 0.2µ Filter sterilfiltriert

5.2.2.3 Aminosäurestocklösungen

Aminosäuremix :	10	ml	L-Arginin (HCl)	240	mg/100 ml
(400 ml)	50	ml	L-Aspartat	1200	mg/100 ml
	50	ml	L-Glutamat	1200	mg/100 ml
	20	ml	L-Isoleucin	240	mg/100 ml
	25	ml	L-Phenylalanin	600	mg/100 ml
	25	ml	L-Serin	4500	mg/100 ml
	25	ml	L-Threonin	2400	mg/100 ml
	100	ml	L-Tyrosin	180	mg/100 ml
	25	ml	L-Valin	1800	mg/100 ml
	10	ml	L-Methionin	240	mg/100 ml

5. Material und Methoden

		(nicht bei Plasmiden mit MET 25 Promotor)
	ad 400 ml	Millipore Wasser und durch 0.2µ Filter sterilfiltriert
Selektive Aminosäuren:	10 ml	L-Adenin 500 mg/100 ml
(pro Liter	10 ml	Uracil 240 mg/100 ml
Mangelmedium)	3 ml	L-Leucin 720 mg/100 ml
	3 ml	L-Lysin 360 mg/100 ml
	2 ml	L-Histidin 240 mg/100 ml
	2 ml	L-Tryptophan 480 mg/100 ml
		durch 0.2µ Filter sterilfiltriert

5.2.3 Zellkulturmedien

DMEM:		Dulbeccos modified Eagle's Medium mit 4,5 g/l Glucose
FCS:		Fetal calve serum (Gibco Life Technologies)
IL-6:	10 ng/ml	humanes rekombinantes Inter- leukin 6 (Strathmann Bioscience)
Epo:	7 U/ml	humanes rekombinantes Erythropoetin (NeoRecormon, Boehringer)
Penicillin/	10000 U	(Biochrom)
Streptomycin	10000 mg/ml	

5.3 Bakterienstämme

DH5 F'	F',endA1, hsdR17, (r _k ⁻ m _k ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (80dlacD(lacZ)M15)
GM2163	F ⁻ , ara-14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx-78, supE44, galK2, galT22 hiG4, rpsL136,(Str ^r), xyl-5, mtl-1, thi-1, dam-13, Tn9, (Cm ^R), dcm-6, hsdR2, mcrA, mcrB1

5.4 Hefestämme

Es wurden ausschließlich Hefestämme vom Typ *S. cerevisiae* verwendet:

L40	MAT a, his3D200, trp1-901, leu2-3,112, ade2, LYS::(lexAop) ₄ -HIS3, URA3::(lexAop) ₈ -LacZ, gal4??, gal80??
-----	---

5.5 Zelllinien

HepG2	humane hepatozelluläre KarzinomaZelllinie (ATCC HB 8064)
NIH 3T3	murine Fibroblasten Zelllinie (ATCC 6442)
293	humane transformierte embryonale NierenZelllinie (ATCC CRL 1573)

5.6 Arbeiten mit DNA und RNA

5.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Mini-Präp)

Zur Gewinnung von kleineren Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Protokoll der alkalischen Lyse angewandt (Qiagen, „*Plasmid Maxi Kit*“). Dazu wurde eine 3 ml Kultur LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Nach Wachstum ü. N. wurden 1.5 ml Bakteriensuspension pelletiert (4', 6.000 upm) und in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer P2 zugefügt und nach 4' 300 µl eiskalter Puffer P3. Nach einer Inkubationszeit von 15' wurde der Niederschlag abzentrifugiert (30', 13.000 upm). Aus dem Überstand wurde mit 0.7x V Isopropanol die Plasmid-DNA gefällt und pelletiert (30', 13.000 upm). Das Pellet ist mit 70% Ethanol gewaschen und abschließend in 20 µl H₂O aufgenommen worden.

5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen (Maxi-Präp)

Zur Gewinnung großer Mengen sauberer Plasmid-DNA wurde eine 100 ml Kultur aus einer 3 ml Vorkultur in LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Nach Wachstum ü. N. bis (OD₆₀₀ = 0.6 - 0.8) wurde die Bakteriensuspension pelletiert (5', 6.000 upm) und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 8 ml Puffer P2 zugefügt und nach 5' 6 ml eiskalter Puffer P3. Nach einer Inkubationszeit von 15' wurde der Niederschlag abzentrifugiert (15', 5.000 upm). Der Überstand wurde mit 0.7x V Isopropanol versetzt und 5' auf Eis inkubiert. Danach ist der Niederschlag pelletiert worden (20', 5.000 upm) und nach Waschen mit 70% Ethanol in 500 µl H₂O resuspendiert worden. Nach Zugabe von 0.1x V 4 M Ammoniumacetatlösung pH 5.5 wurde der Ansatz 10' auf Eis inkubiert und danach der Niederschlag abzentrifugiert (30', 13.000 upm). Der Überstand wurde mit 2,5x V Ethanol versetzt, 10' auf Eis inkubiert, und anschließend pelletiert (30', 13.000 upm). Nach Waschen in 70% Ethanol wurde das Pellet in 200 µl TE / RNase A (6 µg/ml) resuspendiert und ein RNA Verdau durchgeführt (1 h, 37°C). Nach zweimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion und abschließender Chloroform-Extraktion wird der Überstand auf eine Konzentration von 0.4 M LiCl eingestellt, mit 2,5x V Ethanol versetzt und 30' bei -20°C präzipitiert. Nun wurde der Niederschlag pelletiert (30', 13.000 upm) und nach Waschen in 70% Ethanol in 100 µl H₂O aufgenommen.

5. Material und Methoden

5.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA für Transfektionen (Qiagen-System)

Zur Gewinnung großer Mengen sauberer Plasmid-DNA für Transfektionen wurde eine 300 ml Kultur aus einer 3 ml Vorkultur in LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Alle weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers für das „*Plasmid Maxi Kit*“ durchgeführt (Qiagen).

5.6.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung von größeren Mengen RNA aus adhärent wachsenden Zellen bzw. aus Gewebe erfolgte im Prinzip durch die Guanidiniumthiocyanatmethode. Es wurde dabei das Verfahren nach dem „*Ultraspec RNA Isolation System*“ (Biotecx Laboratories, Inc.) entsprechend der Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Isolierung kleinerer Mengen bzw. für eine zusätzliche Reinigung kleinerer Mengen (< 100 µg) wurde das „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen) verwendet.

5.6.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Molekülen in wässriger Lösung geschah photometrisch. Für einen Ansatz wurden in der Regel zwei Verdünnungen 1:500 bzw. 1:250 in H₂O hergestellt und die OD₂₆₀ gegenüber H₂O als Referenz bestimmt. Die Konzentration errechnete sich nach folgender Gleichung:

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{\text{OD}_{260} \cdot V \cdot K}{1000}$$

;bei V = Verdünnungsfaktor
(500/250)
K = spezifischer Koeffizient:
DNA = 50
RNA = 40
Oligonukleotide = 20

5.6.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA wurden 0,8% - 2,0% Agarosegele (0,2 µg/ml w/v Ethidiumbromid) mit 1x TAE als Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 5x Auftragspuffer versehen und bei 90 - 120 V 1 h - 2 h aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert.

5.6.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Hierbei wurde das „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ (Qiagen) entsprechend der Anleitung des Herstellers benutzt.

5.6.8 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsverdaue wurden i. d. R. in einem Endvolumen von 20 ml entsprechend den Vorschriften des Herstellers (Gibco Life Technologies, Boehringer Mannheim, New England Biolabs) ca. 2 h lang durchgeführt. Im allgemeinen wurde ein mehrfacher Überschuß an Restriktionsenzym (1 µl/Ansatz) verwendet. Für präparative Verdaue wurden - wenn möglich - konzentrierte Enzyme (1 µl/Ansatz) in einem Endvolumen von 50 µl verwendet.

5.6.9 Auffüllen überhängender 3'-Enden

Nach Restriktionsverdau überhängende 3'-Enden wurden - wenn nötig - mit T4 Polymerase (New England Biolabs) im Restriktionsverdauansatz entsprechend den Herstellervorgaben aufgefüllt.

5.6.10 Auffüllen überhängender 5'-Enden

Nach Restriktionsverdau überhängende 5'-Enden wurden - wenn nötig - mit Klenow (Gibco Life Technologies) im Restriktionsverdauansatz aufgefüllt.

5.6.11 Dephosphorylieren von DNA-Fragmenten an den 5'-Enden

Nach dem Restriktionsverdau wurde bei DNA-Fragmenten, die als Vektor dienen sollten, der Phosphatrest am 5'-Ende entfernt. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl CIP (Calf Intestine Phosphatase, New England Biolabs) 5' vor Ende des Restriktionsverdaus zugefügt.

5.6.12 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Volumen von 20 µl mit T4-DNA-Ligase (Gibco Life Technologies) 4h - 12h bei RT bzw. 4°C durchgeführt.

5.6.13. Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach der CaCl_2 -Methode hergestellt, aliquotiert und für den späteren Gebrauch weggefroren. Eine 300 ml Kultur wurde aus einer 5 ml ü. N. Kultur in LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 wachsen gelassen. Alle Lösungen wurden aus 1 M CaCl_2 -Stocklösung hergestellt. Danach wurden die Bakterien 30' auf Eis inkubiert, in 6 50 ml Falcons bei 4°C pelletiert. (<3.000 upm, 5') und in vorgekühlter 0,1 M CaCl_2 -Lösung (25 ml/Falcon) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis wurden die Bakterien wieder bei 4°C pelletiert. (<3.000 upm, 5') und in vorgekühlter 0,1 M CaCl_2 -Lösung (2 ml/Falcon) resuspendiert. Alle Suspensionen wurden vereinigt. Nach einer Inkubation von 2 h auf Eis wurde zu den Bakterien Glycerol in einer Endkonzentration von 20% gegeben (3 ml/Falcon) und die Bakterien wurden aliquotiert bei -80°C weggefroren.

5.6.14 Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden jeweils 100 µl aufgetauter kompetenter Bakterien mit 5-100 ng Plasmid DNA 45' auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45'' bei 42°C, 1' auf Eis) wurden die Bakterien 1 h bei 37°C in 900 µl LB-Medium wachsen gelassen. Danach sind die Bakterien pelletiert und in 200 µl resuspendiert worden. Von dieser Suspension wurden 50-100 µl auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37°C wachsen gelassen.

5.6.15 Einfrieren und Auftauen von Bakterienzellen

Aliquots einer Bakterienkultur wurden aufbewahrt, indem unter sterilen Bedingungen 500 µl Kultur mit 500 µl Glycerol gemischt und bei -70°C weggefroren wurden. Zum Auftauen wurde mit einer sterilen Spitze etwas Bakterienmasse von der Oberfläche abgekratzt und in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben.

5.6.16 Sequenzierung von DNA

DNA wurde nach dem Kettenabbruchverfahren mit dem „*Sequenase-Kit 2.0*“ oder dem „*Deaza-Kit*“ (USB) nach den Vorgaben des Herstellers sequenziert. Als radioaktiv markiertes Nukleotid diente γ - ^{35}S -dATP.

Die Sequenzierproben wurden gelelektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6% Polyacrylamid / 7 M Harnstoff) unter Benutzung einer Modell-S2-Apparatur (Gibco Life Technologies) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei ca. 50°C mit einer Leistung von 65 W für 2 - 5 h durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x bzw. 3x TBE. Anschließend wurde das Gel 30' in 15% Essigsäure geschüttelt und bei 70°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte für 1 - 7 Tage bei RT.

5.6.17 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „*Megaprime-Kits*“ (Amersham) durch random priming und anschließenden Einbau von γ - ^{32}P -dCTP hergestellt. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 50 ng des zu markierenden Fragmentes, 50 μCi γ - ^{32}P -dCTP und 5 U Klenow-Fragment hinzugefügt (1 h bei 37°C). Nicht eingebaute Nukleotide und kleine Oligonukleotide wurden durch Gelfiltration mit „*Nunc Trap Push-Column*“ (Stratagene) abgetrennt. Die spezifische Aktivität (ermittelt durch Cerenkov-Zählung) betrug i. d. R. $2 \cdot 10^5$ bis $2 \cdot 10^6$ cpm/ μl . Direkt vor der Hybridisierung wurde die markierte Sonde 5' bei 95°C denaturiert.

5.6.18 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden durch Auffüllen des überhängenden 5'-Endes radioaktiv mit dem Klenowfragment markiert. Als radioaktives Substrat der Polymerase diente γ - ^{32}P -dCTP bzw. ATP, es wurden die Enzyme und Puffer von Gibco Life Technologies entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Inkubation von 1h bei 37°C wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Gelfiltration mit Hilfe des „*Oligonucleotid Removal Kits*“ (Qiagen) entfernt.

5.6.19 Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen geschah nach der „gravity-aided alkali“-Transfermethode. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde bei DNA, die größer ist als 800 bp, das Gel für 15' in 0,25 N HCl zum Fragmentieren der DNA geschüttelt. Das Gel wurde anschließend für 5 - 12 h auf eine geladene Nylonmembran („N+", Amersham) mit 0.4 N NaOH transferiert. Nach kurzem Neutralisieren in 2x SSC wurde die Membran hybridisiert.

5.6.20 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Sollte die nach 5.6.4 präparierte RNA zur späteren Analyse mit radioaktiv markierten Sonden auf Nitrozellulosemembran transferiert werden, erfolgte die Auftrennung der RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen. Hierzu wurden 10 - 20 µg RNA-Lösung in 30 ml Denaturierungspuffer gelöst. Nach der Denaturierung (15', 56°C) wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt und 6 µl RNA-Auftragspuffer hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen (1%) elektrophoretisch ü. N. bei 25 V aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x MOPS. Danach wurde das Gel 30' in 20x SSC geschüttelt und daraufhin die RNA auf eine Membran transferiert (5.6.21).

5.6.21 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran geschah im Prinzip nach dem gleichen Verfahren, wie der Transfer von DNA (5.6.19). Als Transferpuffer wurde 20x SSC benutzt. Nach dem Transfer (6 h - 8 h) wurde die Membran zum Fixieren der RNA mit UV-Licht behandelt (UV-Crosslinker, Stratagene).

5.6.22 Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nylonmembranen (Southern Blot & Northern Blot)

Alle Schritte der Hybridisierung von DNA liefen in einem Hybridisierungsröhrchen ab. Um eine unspezifische Bindung der radioaktiven DNA-Sonde zu verhindern, wurde der Blot zuerst mit 10 ml Prähybridisierungslösung 2 h bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte ü. N. die Hybridisierung mit 10 ml Hybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte Sonde (1.000.000 cpm/ml)

enthielt. Vor der Zugabe der Sonde in die Hybridisierungslösung wurde die Sonde denaturiert (5' bei 95°C). Nach der Hybridisierung wurde von der Membran unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen in Waschlösungen mit verschiedenen Salzkonzentrationen (2x SSC / 0,1% SDS bis 0,5x SSC / 0,1% SDS) bei 68°C entfernt. Schließlich wurde für die Autoradiographie ein Film und eine Verstärkerfolie aufgelegt und 1 d - 14 d belichtet.

Alle Schritte der Hybridisierung von RNA liefen in einem Kunststoffbehälter ab, in dem die Membran eingeschweißt worden war. Um eine unspezifische Bindung der radioaktiven DNA-Sonde zu verhindern, wurde die Membran zuerst mit 10 ml Hybridisierungslösung 2 h bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte ü. N. die Hybridisierung mit 10 ml Hybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte Sonde (1.000.000 cpm/ml) enthielt. Vor der Zugabe der Sonde in die Hybridisierungslösung wurde die Sonde denaturiert (5' bei 95°C). Nach der Hybridisierung wurde von der Membran unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen in 2x SSC / 0,1% SDS bei Temperaturen von 55°C - 60°C entfernt. Schließlich wurde für die Autoradiographie ein Film und eine Verstärkerfolie aufgelegt und 1 d - 14 d belichtet.

5.6.23 Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nitrozellulosemembranen

Die Membran wurde zum Fixieren der DNA für 2 h unter Vakuum bei 80°C gebacken und anschließend nach Angaben des Herstellers der Genbibliotheken (Stratagene) hybridisiert.

5.6.24 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion wurde zum Nachweis von cDNA mit Taq-Polymerase (Boehringer) oder zu Klonierungszwecken mit Vent-Polymerase (New England Biolabs) in einem Thermocycler der Firma Techne bzw. Biometra nach Angaben der Hersteller in 50 µl Volumen durchgeführt. Der Ansatz wurde mit 100 µl Siliconöl überschichtet und i. d. R. 30 Zyklen lang amplifiziert (45'' bei 95°C, 45'' bei ca. 55°C, 1' bei 72°C). Die verschiedenen Anlagerungstemperaturen wurden aus dem G/C Gehalt und der Länge der Primer abgeschätzt.

5.6.25 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Die reverse Transkription wurde mit MMLV-RT zu Nachweiszwecken bzw. Superscript-RT (beide von Gibco Life Technologies) zu Klonierungszwecken entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.6.26 DNase I Verdau von RNA

Zur Vermeidung von DNA Kontaminationen bei der cDNA Synthese wurde die RNA vorher mit DNase I („*Amplification Grade*“, Gibco Life Technologies) im Reversen Transkriptionspuffer verdaut, um die enthaltene DNA zu entfernen. Die so erhaltene RNA wurde direkt für eine cDNA-Synthese eingesetzt.

5.6.27 Rapid Amplification of cDNA ends (RACE-PCR)

Für die Isolierung von 5′ bzw. 3′-Enden einer cDNA ist folgendes Protokoll angewendet worden. Zuerst wurde mit 1 - 5 µg total oder Poly A+ RNA und 0,15 µg Primer (genspezifisch für die Isolierung des 5′-Endes bzw. 3′-RACE Primer für die des 3′-Endes) eine cDNA Synthese durchgeführt (6.25). Nach Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die verbleibende RNA mit RNase H (2 Units, Gibco Life Technologies) degradiert (37°C, 20′) und über Säulen aufgereinigt (6.7). Für die Amplifikation der 5′-Enden mit dem 3′-RACE Primer mußte an das 5′-Ende der cDNA mit Terminaler Desoxyribonucleotidyl Transferase (TdT, Promega) ein PolyA-Schwanz gehängt werden (37°C, 30′). Die TdT kann durch Hitze inaktiviert werden (70°C, 10′) und der gesamte Ansatz wurde mit TE auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Für die anschließenden PCR Reaktionen mit versetzt liegenden Primern (5.6.24) wurden jeweils 1 µl des RACE-Ansatzes eingesetzt.

5.6.28 Absuchen einer cDNA Genbibliothek

Zur Isolierung einer vollständigen cDNA wurden mehrere cDNA Genbibliotheken des Typs „*Lambda ZAP Express*“ (Statagene) verwendet. Dabei ist das Protokoll des Herstellers zur Anwendung gekommen. Als Filter sind „*Optitran BA-S85 Reinforced NC*“ (Schleicher & Schüll) benutzt worden.

5.7 Arbeiten mit Proteinen

5.7.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einer Minigelapparatur (8 cm Trenngel, 2 cm Sammelgel bei einer Dicke von 0,75 mm) durchgeführt. Alle Proteinproben wurden vorher 5' bei 95°C in 2x SDS-Probenpuffer denaturiert und bei 20-30 mA ca. 2 h lang aufgetrennt. Zur Detektion von S³⁵-Methionin markierten Proteinen wurde das Gel danach für 15' in Fixierlösung fixiert, 30' in Verstärkerlösung (1 M Natriumsalicylat) inkubiert, 2 h bei 80°C getrocknet und ü. N. mit einem Film exponiert.

5.7.2 Gesamtproteinextraktion aus Bakterien

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Bakterien wurde eine 5 ml Kultur ü.N. angeimpft und am nächsten Tag bei einer OD₆₀₀ von 0,6 pelletiert (6.000 upm, 5'). Das Pellet wurde in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5' bei 95°C aufgeköcht. Nach dem Abzentrifugieren der Festbestandteile (13.000 upm, 5') wurden aus dem Überstand 5 µl durch SDS-PAGE analysiert.

5.7.3 Gesamtproteinextraktion aus Hefen

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Hefen wurde eine 30 ml ü.N. Kultur angeimpft, am nächsten Tag bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,1 pelletiert (6.000 upm, 5') und einmal mit bidest gewaschen. Das Pellet wurde daraufhin in 300 µl Proteinextraktionspuffer resuspendiert und 5' bei 95°C aufgeköcht. Nach dem Abzentrifugieren der Festbestandteile (13.000 upm, 5') wurden aus dem Überstand 40 µl durch SDS-PAGE analysiert.

Proteinextraktionspuffer:	60 mM	Tris-HCl ph 6,8
	10% v/v	Glycerol
	2% w/v	SDS
	3.5% v/v	-Mercaptoethanol
	0.0025% w/v	Bromphenolblau

5.7.5 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Herstellung von einem Ganzzell-Proteinextrakt wurden adhärent konfluent gewachsene Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend in 1 ml eiskaltem PBS mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellkulturschale wurde noch einmal mit 0,5 ml eiskaltem PBS abgespült. Dieses Volumen wurde mit dem ersten vereinigt und die Zellen wurden pelletiert (2.000 upm, 2'). Das Pellet wurde in 50 µl WCE-Puffer / 1% v/v Nonidet-P40 resuspendiert und 5' auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren aller unlöslichen Zellbestandteile wurde aus dem Überstand mit 2 µl eine Proteinbestimmung durchgeführt. Der Überstand kann bei -20°C bzw. -70°C gelagert werden und sollte nicht öfter als einmal aufgetaut werden. Für eine Analyse durch SDS-PAGE wurden ca. 100 µg Protein (pro Spur) mit 2x SDS-Probenpuffer 5' bei 95°C denaturiert und auf ein Gel aufgetragen.

WCE-Puffer:	50 mM	Hepes, pH 7,8
	20 mM	NaF
	1 mM	Na ₂ VO ₄
	1 mM	Na ₃ MoO ₄
	450 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	25% v/v	Glycerol

Aliquotieren und bei -20°C lagern. Nach dem Auftauen folgendes zusetzen:

1 µg/ml	Aprotinin (10 mg/ml)
1 µg/ml	Leupeptin (10 mg/ml)
0,5 mM	PMSF (500 mM)
1 mM	DTT (100 mM)
1% v/v	Nonidet-P40 (10% v/v)

5.7.5 In-vitro Translation von Proteinen

Zur *in-vitro* Translation wurde das „TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate“-System (Promega) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Kontrolle wurde vor Zugabe des Aminosäuregemisches ohne Cystein aus dem Gesamtansatz 9 µl entnommen und nach

5. Material und Methoden

Zugabe von 1 μl S^{35} -Methionin (10 mCi/ml) separat translatiert. Aus diesem Ansatz wurden dann 5 μl durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

5.7.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurde das Verfahren nach Bradford angewandt. Es wurden jeweils 100 μl Proteinlösung in verschiedenen Verdünnungen mit 1 ml Bradford Reagenz versetzt, 15' bei RT inkubiert und ihre Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Parallel wurde aus mehreren Eichlösungen (BSA in H_2O) auf gleiche Weise eine Eichkurve erstellt. An der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Lösung abgelesen werden.

Bradford Reagenz:	100 mg	Serva Blue G
	50 ml	Ethanol
	100 ml	Phosphorsäure
		ad 1 l H_2O

5.7.7 Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Western Blot)

Um Proteine auf Membranen zu immobilisieren, wurde das semi-dry Verfahren in einer Apparatur der Firma Keutz laut Anleitung des Herstellers mit einer Hybond C Membran (Amersham) verwendet:

Kathodenpuffer:	25 mM	Tris-HCl
	40 mM	6-Aminohexansäure
	20% v/v	Methanol
		auf pH 9,4 einstellen
Anodenpuffer 1:	25 mM	Tris-HCl
	20% v/v	Methanol
		auf pH 10,4 einstellen
Anodenpuffer 2:	300 mM	Tris-HCl
	20% v/v	Methanol
		auf pH 10,4 einstellen

5. Material und Methoden

Transferiert wurde 2 h lang bei 1.5 mA/cm². Danach wurde die Membran zur Kontrolle des Transfers kurz mit Ponceau gefärbt, mit PBS entfärbt, 4 h in PBS / 0,1% Tween 20 / 3% Magermilchpulver geblockt und 4 h bei RT (oder ü. N. bei 4°C) mit dem 1. Antikörper (1:2.000 in PBS / 0,1% Tween 20 / 3% Magermilchpulver) inkubiert. Nach 6x Waschen in PBS / 0,1% Tween 20 wurde die Membran 90' mit dem 2. Antikörper (Peroxidase gekoppelt) inkubiert. Nach 4x Waschen in PBS / 0,1% Tween 20 und 2x Waschen in PBS wurde die Membran mit dem „Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate“ (Boehringer) entwickelt.

5.7.8 Rekombinante Expression von Proteinen in Bakterien

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde entweder das Glutathion-S-Transferase System (Pharmacia) oder das „His-Tag“ System (Qiagen) verwendet. Nachdem das gewünschte Gen in den Expressionsvektor ligiert wurde, sind für die Induktion, Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine die Angaben der Hersteller benutzt worden. Für die Renaturierung unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigter Proteine wurde folgendes Protokoll verwendet (Qiagen). Die Proteine wurden in Harnstofflösung gegen den Renaturierungspuffer jeweils 12 h bei 4° C so dialysiert, daß die Harnstoffkonzentration um ein Mol/Liter abgenommen hat. Nach dem letzten Schritt wurden die Proteine gegenüber einem Lösungspuffer dialysiert, dann aliquotiert und weggefroren.

Renaturierungspuffer:	20 mM	HEPES, pH 7,9 (mit KOH einstellen)
	50 mM	Glycin
	10% v/v	Glycerol
	0,1% v/v	Nonidet-P40
	300 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂
	1:1000	Proteaseinhibitoren/DTT
Lösungspuffer:	20 mM	HEPES, pH 7,9 (mit KOH einstellen)
	25 mM	Glycin
	300 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂

5.7.9 Kopräzipitation von Proteinen *in-vitro*

Für die Kopräzipitation von Proteinen wurde ein Bindungspartner rekombinant „RGS His“ Epitop exprimiert (5.7.8) und sein möglicher Interaktionspartner durch *in-vitro* Translation in Gegenwart von S^{35} Methionin hergestellt (5.7.5). Zunächst wurde das rekombinante Protein in NP40-Puffer 30' bei Raumtemperatur an eine magnetische NTA-Matrix gekoppelt ("His-Beads", Qiagen) und danach mit 10 μ l *in-vitro* Translatat weitere 4 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit IP-Puffer sind die gebundenen Proteine danach mit NP40-Puffer / 500 mM Imidazol von den "His-Beads" eluiert und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie (5.7.1) analysiert worden.

NP40-Puffer:	50 mM	Tris, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1% v/v	Nonidet-P40
	1:1000	Proteaseinhibitoren/DTT
	25 mM	Imidazol

5.7.10 Kopräzipitation von Proteinen *in-vivo*

Für die Kopräzipitation wurden NIH 3T3 Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert (5.9.3) und am nächsten Tag nach zweimaligem Waschen in PBS mit IP-Lysis-Puffer lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (30', 14.000 upm 4°C) von festen Bestandteilen getrennt und anschließend einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterworfen (5.7.6). Nach einem Test auf die Expression der gewünschten Proteine (5.7.1 und 5.7.7) wurden gleiche Mengen Lysat ü. N. bei 4° C mit 10 μ l vorher äquilibrierten "His-Beads" auf einem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die "His-Beads" mehrmals mit IP-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteinkomplexe mit IP-Puffer / 500 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde daraufhin weiter analysiert (5.7.1 und 5.7.7).

IP-Lysis-Puffer:	10 mM	HEPES, pH 7,2
	142,5 mM	KCl
	1 mM	EGTA (Kaliumsalz)
	0,2% v/v	Nonidet-P40
	1:1000	Proteaseinhibitoren/DTT

5. Material und Methoden

IP- Puffer:	10 mM	HEPES, pH 7,2
	142,5 mM	KCl
	1 mM	EGTA (Kaliumsalz)
	0,2% v/v	Nonidet-P40
	1:1000	Proteaseinhibitoren/DTT
	25 mM	Imidazol

5.8 Arbeiten mit Hefe

5.8.1 Transformation von Hefezellen

Hefezellen wurden mit der Lithiumacetatmethode chemisch transformiert. Dabei wurde eine ü. N. Vorkultur in 30 ml YPD verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Hefen wurden pelletiert (2.000 upm, 5'), einmal mit H₂O gewaschen und dann in 1 ml H₂O aufgenommen. Alle verwendeten Lösungen wurden frisch aus Stocklösungen hergestellt. Nun wurden die Hefen erneut pelletiert (2.000 upm, 5'), in 1 TE / LiAc gewaschen und in 1 ml TE / LiAc resuspendiert.

Ein Transformationsansatz bestand aus:

50 µl	Hefesuspension in TE / LiAc
50 µg	Heringssperma-DNA (10 mg/ml)
1 µg	Plasmid-DNA
300 µl	TE / LiAc / 40% PEG 4000

Dieser Ansatz wurde zuerst 30' bei 30°C und nachfolgend weitere 15' bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Hefen pelletiert (2.000 upm, 5') und in 300 µl H₂O aufgenommen, wovon 200 µl auf den entsprechenden Platten ausgestrichen wurden, welche danach mehrere Tage bei 30°C im Wärmeschrank zum Hochwachsen der Hefekolonien inkubiert worden sind.

10x TE:	100 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA, pH 7,5
		steril filtriert

5. Material und Methoden

10x LiAc:	1 M	LiAc, pH 7,5 steril filtriert
50% PEG 4000:	50% w/v	PEG 4000 autoklavieren

5.8.3 Etablieren von Hefeklonen

Die Hefeklone wurden mit sterilen „*Inoculationloops*“ (Nunc) auf entsprechenden Platten ausgestrichen (8 Klone pro Platte) und wachsen gelassen. Die Platten konnten bis zu 3 Monate bei 4°C gelagert werden.

5.8.4 Einfrieren und Auftauen von Hefezellen

Ein Hefeklon wurde ü. N. in 10 ml YPD wachsen gelassen, pelletiert und in 1 ml 2x YPD / 50% Glycerol resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis inkubiert und dann bei -80°C weggefroren. Durch Abkratzen einer kleinen Menge von der Oberfläche der gefrorenen Kultur und Ausstreichen auf einer entsprechenden Platte konnten die Hefen wieder aufgetaut werden.

5.8.5 Induktion und Repression von Hefepromotoren durch selektive Medien

Zur Induktion / Repression des Gal4-Promotors wurden die Hefen in 2 ml SR-Selektivmedium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Danach wurden 100 - 200 ml der Kultur in 2 ml SR-Selektivmedium / 3% Glucose zur Repression des Gal4-Promotors bzw. in 2 ml SR-Selektivmedium / 3% Galaktose zur Induktion des Gal4-Promotors angeimpft. In der Regel wurde diese Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,4 in einem Assay eingesetzt.

Zur Induktion des Met25-Promotors wurden die Hefen entweder in Abwesenheit von Methionin in dem entsprechenden Selektivmedium kultiviert, oder nach Repression durch 1 mM Methionin bei einer OD₆₀₀ von 0,6 pelletiert, 2x mit H₂O gewaschen und dann in dem entsprechenden Selektivmedium ohne Methionin 5 h kultiviert.

5. Material und Methoden

Zur Repression des Met25-Promotors wurden die Hefen in Anwesenheit von 1 mM Methionin in dem entsprechenden Selektivmedium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 in einem Assay eingesetzt.

Stammlösungen:

30%	w/v	Glucose
30%	w/v	Galaktose
16	mM	Methionin

5.8.6 -Galaktosidase-Assay

Für eine Messung der -Galaktosidaseaktivität in Hefen wurde eine 2 ml Kultur in dem entsprechenden Selektivmedium unter gewünschten Bedingungen (5.8.5) angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 umgeimpft (100 - 200 µl in 3 ml). Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 wurden die Hefen pelletiert und in 1,2 ml Z-Puffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 100 – 150 µl (= Volumen V_E) in Z-Puffer ad 1 ml verdünnt (in einem Eppendorfgefäß); der Rest wurde zur Messung der Kulturdichte (OD₆₀₀) verwandt. Nach Zugabe von 15 µl Chloroform und 10 µl SDS-Lösung (0,1% w/v) wurden die Hefen durch verwirbeln (5'') aufgeschlossen. Nach Äquilibrieren bei 30°C und Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (vorher bei 30°C äquilibriert) wurde die Reaktion gestartet. Bei einer deutlich sichtbaren Gelbfärbung bzw. spätestens nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₄ gestoppt (Messung der Reaktionsdauer t_R). Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (13.000 upm, 5') wurde bei jedem Reaktionsansatz die OD₄₂₀ bestimmt. Zur Kontrolle des letzten Zentrifugations-schrittes wurde stichprobenartig bei einigen Ansätzen die OD₅₅₀ bestimmt, welche i. d. R. den Wert Null hatte. Zur Kalibrierung des Photometers wurde ein kompletter Blindansatz ohne Hefesuspension benutzt. Der Wert für die -Galaktosidaseaktivität errechnete sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{1000 * \text{OD}_{420} (-1750 * \text{OD}_{550})}{\text{OD}_{600} * \text{V}_E * t_R}$$

Z-Puffer:	60	mM	NaH ₂ PO ₄ x7 H ₂ O
	40	mM	Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O
	10	mM	KCl
	1	mM	MgSO ₄ x7 H ₂ O

5. Material und Methoden

	50 mM	-Mercaptoethanol
		auf pH 7,0 einstellen
ONPG:	4 mg/ml	o-Nitrophenol Galaktose
	in 0,1 M	KPO ₄ , pH 7,0
		sterilfiltriert und als Aliquots bei -20°C gelagert

5.8.7 Absuchen einer Genbibliothek durch Selektion in Hefe („Two-Hybrid“ System)

Für das Absuchen einer cDNA Genbibliothek durch Histidinselektion der Hefen im „Two-Hybrid“ System wurde ein modifiziertes Transformationsprotokoll nach 5.8.1 verwendet. Der Hefeklon, der bereits das LexA-Gfi Konstrukt besaß, wurde in entsprechendem YC Minimalmedium angeimpft und dann auf 500 ml mit YPAD verdünnt. Die Hefezellen wurden dann analog zu 8.1 weiterbehandelt und schließlich in 10 ml TE / LiAC mit 50 µg Genbibliothekplasmid in 1ml Carrier DNA und 70 ml TE / LiAC / 40% PEG 4000 transformiert. Nach dem Hitzeschock in Anwesenheit von 8,5 ml DMSO (42°C, 6') wurde der Ansatz mit 100 ml kaltem YEP gekühlt, mit 200 ml YEP gewaschen, und in 500 ml YPAD eine Stunde wachsen gelassen. Nun wurde ein Aliquot unter nicht histidinselektiven Bedingungen zur Bestimmung der primären Transformationsrate ausplattiert. Der Transformationsansatz konnte dann 8 - 10 h unter nicht histidinselektiven Bedingungen in YC-Medium wachsen. Danach wurde ein zweites Aliquot zur Bestimmung der sekundären Transformationsrate unter nicht histidinselektiven Bedingungen ausplattiert. Der Rest der Transformation wurde unter selektiven Bedingungen auf 14 cm Ø YC-Platten ausplattiert. Die Histidinselektion fand für ca. 3 - 4 d statt.

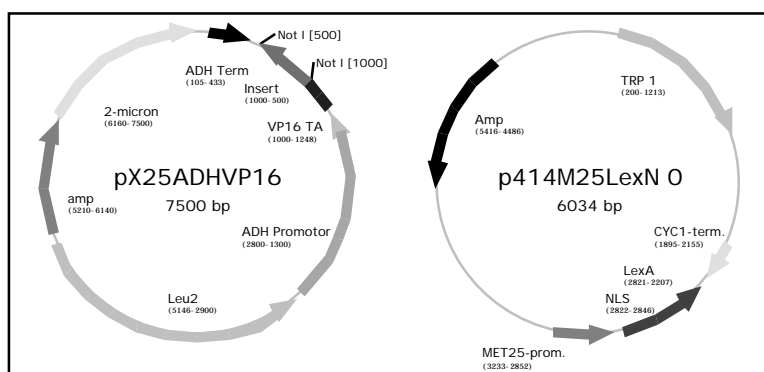


Abb. 22: Karte der verwendeten Hefeplosmide
links: Genbibliotheksplasmid
rechts: Expressionsplasmid für die LexA Fusionsproteine

5.9 Arbeiten mit Zellen

5.9.1 Passagieren von Zellen

Um adhärent wachsende Zellen von einer Zellkulturschale auf andere zu verteilen, wurden diese zunächst 1x mit PBS gewaschen und danach mit 0,5% Trypsin / 0,2% EDTA (Biochrom) bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Schalenboden gelöst hatten, wurde durch Zugabe von 5 Volumenanteilen Medium der Prozeß gestoppt, und die Zellsuspension sofort auf die anderen Zellkulturschalen verteilt.

5.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach 5.9.1 vom Schalenboden gelöst und pelletiert (2.000 upm, 5'). Das Pellet wurde in 500 µl Einfriermedium E1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem „Cryo Tub“ (Nunc) zu 500 µl Einfriermedium E2 gegeben, gemischt und sofort bei -70°C weggefroren. Die langfristige Lagerung geschah in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen wurde ein „Cryo Tub“ im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis der Inhalt fast komplett aufgetaut gewesen ist. Nach Pelletieren der Zellen (2.000 upm, 5') wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in entsprechendem Medium resuspendiert und auf einer 10 cm Ø Zellkulturschale ausgesät.

Einfriermedium E1:

50%	v/v	FCS
50%	v/v	DMEM

Einfriermedium E2:

22%	v/v	DMSO
	in	DMEM

5.9.3 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen für Reporterassays oder Immunfluoreszenzstudien wurde die Calciumphosphatpräzipitationsmethode gewählt. Dafür wurde Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt und in sterilem H₂O aufgenommen.

5. Material und Methoden

Anschließend wurde für Reporterassays eine Lösung von 132 µl Plasmid DNA in H₂O (=2 Dreifachansätze) mit 18 µl 2 M CaCl₂ versetzt und unter Verwirbeln (Vortex) tröpfchenweise zu 150 µl 2x HBS-Phosphat hinzugefügt. Der Niederschlag wurde in einer Schale mit 24 Vertiefungen auf die Zellen gegeben. Nach 16 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Medium versetzt. Für Immunfluoreszenzstudien in 6 cm Ø Schalen wurden ein Volumen von 264 µl Plasmid-DNA in H₂O, 36 µl 2 M CaCl₂, und 300 µl 2x HBS-Phosphat verwendet.

2x HBS-Phosphat:	10 g/l	HEPES, pH 7,05
	16 g/l	NaCl
	0,74 g/l	KCl
	2 g/l	Dextrose
		Aliquotieren und bei - 20°C lagern

Für die Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen für Expressionsstudien wurde die Elektroporationsmethode gewählt. 5*10⁶ NIH 3T3 Zellen in 180 µl DMEM wurden pro 10 Ø cm Schale mit bis zu 20 µg Plasmid DNA bei 240 V und 500 µF elektroporiert (Biorad Elektroporator) und 1 - 2 Tage später geerntet (5.7.4).

5.9.4 Reporterassay

Um den Einfluß von Proteinen auf die Aktivierung eines Promotors zu messen, wurde Plasmide benutzt, in denen der zu untersuchende Promotor die Transkription eines Luciferase-Gens initiiert (pGL Luciferase-Reporter, Promega). Für ein Experiment wurden 40.000 Zellen / Loch einer 24 Loch Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach 9.3 mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. 6 - 8 Stunden vor dem Ernten am nächsten Tag sind die Zellen u. a. mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren stimuliert worden. Vor dem Ernten ist jede Schale 2x mit PBS gewaschen worden und danach mit 300 µl Lysis-Puffer versetzt worden. Die Zelllysate wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (5', 14.000 upm, 4°C). 50 µl des Überstandes sind anschließend in einem Luminometer (Berthold) mit 400 µl Assay-Puffer und 100 µl Reaktionsgemisch 15'' vermessen worden.

5. Material und Methoden

Lysis-Puffer:	1 ml		Triton X-100
	25 ml	0,1 M	Glycylglycin, pH 7,8 (Kaliumsalz)
	1,5 ml	1 M	MgSO ₄
	0,8 ml	0,5 M	EGTA (Kaliumsalz)
	0,1 ml	1 M	DTT (frisch zum Ansatz geben)
	ad 100 ml		mit H ₂ O auffüllen
Assay-Puffer:	1,5 ml	1 M	KPO ₄ , pH 7,8
	1,5 ml	1 M	MgSO ₄
	0,8 ml	0,5 M	EGTA (Kaliumsalz)
	2 ml	0,1 M	ATP
	0,1 ml	1 M	DTT (frisch zum Ansatz geben)
	ad 100 ml		mit H ₂ O auffüllen
Reaktionsgemisch:	3,75 ml	0,1 M	Glycylglycin, pH 7,8 (Kaliumsalz)
	1,4 ml	1 M	Luziferin in H ₂ O
	0,007 ml	1 M	DTT (frisch zum Ansatz geben)
	ad 7 ml		mit H ₂ O auffüllen

5.9.5 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzstudien wurden 100.000 Zellen pro 6 cm Ø Schale auf zwei Objekträgergläschen (22 mm x 22 mm) ausgesät und am darauffolgenden Tag mit bis zu 10 µg DNA nach 5.9.4 transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, teilweise 3 - 4 h in DMEM gehungert und vor dem Fixieren u. a. mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren stimuliert:

- 2x mit PBS waschen
- 10' mit Methanol fixieren
- 1x mit PBS waschen
- (eventuell Zellkern mit Propidiumiodidlösung färben)
- 1x mit Immunfluoreszenzpuffer waschen
- 30' mit Blocklösung blockieren
- 1 h mit 1. Antikörper inkubieren
- 2x 5' mit Immunfluoreszenzpuffer waschen

- 30' mit 2. Antikörper inkubieren
- 2x 5' mit Immunfluoreszenzpuffer waschen
- auf Objektträgern mit Aquamount (BDH Laboratories) eindecken

Immunfluoreszenzpuffer:	10 mM	Tris pH 7,5
	300 mM	NaCl
	0,05% v/v	Tween 20

Blocklösung:

1% BSA in Immunfluoreszenzpuffer

Propidiumiodidlösung:

1:1000 Propidiumiodid (in Zitratpuffer) in PBS

10µg/ml RNase A

5.10 Verwendete Antikörper und Oligonukleotide

5.10.1 Antikörper und ihre Hersteller

Anti-Flag Epitop M2	Maus	Stratagene
Anti-Maus F(ab)2 TRITC gekoppelt	Ziege	Dianova
Anti-Maus Peroxidase gekoppelt	Ziege	Dianova
Anti-Phospho Stat3	Rabbit	NEB
Anti-Rabbit F(ab)2 TRITC gekoppelt	Ziege	Dianova
Anti-Rabbit Peroxidase gekoppelt	Ziege	Dianova
Anti-RGS His Epitop	Maus	Qiagen

5.10.2. Oligonukleotide und ihre Sequenz

Gfi-A	5'-CGGGATCCATGCCGCGCTCATTCCTGG-3
Gfi-A(H)	5'-CCCAAGCTTACCACCATGCCGCGCTCATTC-3

Gfi-B	5'-CGGAATTCTTACTCGAGGGTGCAAAGCAGCTCCGA-3
Gfi-CII	5'-CGGAATTCTTACTCGAGTTTGAGTCCATGCTGAGT-3
Gfi-D	5'-CGGGATCCATGTGCATCAAATGCAGCA-3
Gfi-D(Koz)	5'-CGGGATCCACCATGTGCATCAAATGCAGCA-3
Gfi-E	5'-GGAATTCTTACTCGAGAGACCGCGGCTGGTG-3
Gfi-F	5'-CGGGATCCATGCCGGGGCCGGACTACTC-3
Ba-3	5'-TCGATGGTCAAGTCAATGAC-3
Ba-24	5'-GGGAAGGGCTGGAATGGCCG-3
Ba-B(Xho)	5'-CCCGCTCGAGGTCCAAGGAAATGACGTCTGACC-3
Ba-5'	5'-GACTCGAGTCGACATCGAT-T ₁₆ -3
His(K)	5'-ACGCGTCGACCACCATGAGAGGATCGCATCACC-3

5.11 Verwendete Geräte und Computerprogramme

5.11.1 Liste der verwendeten Spezialgeräte und ihre Hersteller

Bioimmager FujiBAS 1500	Raytest
Computer & Drucker	Apple
Elektroporationsgerät Gene pulser II	Biorad
konfokales Laser Scanning Microscope (LSM)	Zeiss
Luminometer LB 9507	Berthold
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia
Szintillationsmeßgerät Wallac 1410	Pharmacia

5.11.2 Liste der verwendeten Computerprogramme und ihre Hersteller

Bildanalyse AIDA	Raytest
Bildanalyse Photoshop 5.0	Adobe
Datenbankanalyse Blast 2.0	NCBI
Proteinanalyse PROSITE	EBI
Grafikdesign Freehand 7.0	Macromedia
Sequenzanalyse Lasergene Package	DNASTar
Textverarbeitung Office 98 (Macintosh)	Microsoft
Tabellenkalkulation Cricket Graph III	Computer Associates

6. Literaturverzeichnis

- Akaishi, H., Takeda, K., Kaisho, T., Shineha, R., Satomi, S., Takeda, J., Akira, S. (1998)**
Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T-lymphocytes.
Int. Immunol. :1747-1751
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., (1994)**
Molecular Biology of THE CELL
erschienen by Garland Press
- Algarde, M., Lecine, P., Costello, R., Plet, A., Olive, D., Imbert, J. (1995)**
In vivo regulation of interleukin-2 receptor gene transcription by the coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary T cells.
EMBO 14: 5060-5072
- Allen, J.B., Walberg, M.W., Edwards, M.C., Elledge, S.J. (1995)**
Finding prospective Partners in the Library: the two-hybrid system and phage display find a match.
TIBS 20: 511-516
- Aringer, A., Cheng, A., Nelson, J.W., Chem, M., Sudashan, C., Zhou, W.-J., O'Shea, J.J. (1999)**
Janus Kinases and their Role in Growth and Disease.
Life Sciences 64: 2173-2186
- Ascherman, D.P., Migone, T., Friedmann, M. C., Leonard, W.J. (1997)**
Interleukin-2 (IL-2)-mediated Induction of the IL-2 Receptor Chain Gene.
J. Biol. Chem. 272: 8704-8709
- Atherton-Fessler, S., Hannig, G., Piwnica-Worms, H.(1993)**
Reversible tyrosine phosphorylation and cell cycle control.
Sem. Cell Biol. 4: 433-442
- Attisano, L., Wrana, J.L. (1998)**
Mads and Smads in TGF signalling
Curr. Opin. Cell Biol. 10: 188-194
- Bagley, C.J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C., Lopez, A.F. (1997)**
The Structural and Functional Basis of Cytokine Receptor Activation: Lessons From the Common Subunit of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 Receptors.
Blood 89: 1471-1482
- Baird, A.M., Gerstein, R.M., Berg, L.J. (1999)**
The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development.
Curr. Opin. Immunol. 11: 157-166

Barinaga, M. (1999)

New Clues to How Proteins Link Up to Run the Cell.

Science 283: 1247-1249

Bazan, J.F. (1990)

Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.

Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6934-6938

Benoist, C., Mathis, D. (1997)

Selection for Survival ?

Science 276: 2000-2001

Besser, D., Bromberg, J.f., Darnell, J.E., Hanafusa, H. (1999)

A Single Amino Acid Substitution in the v-Eyk Intracellular Domain Results in Activation of Stat3 and Enhances Cellular Transformation.

Mol. Cell. Biol. 19: 1401-1409

Bhalla, U.S., Iyengar, R. (1999)

Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways.

Science 283: 381-387

Bourne, H.R. (1997)

How receptors talk to trimeric G proteins.

Curr. Opin. Cell Biol. 9: 134-142

Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. Darnell, J.E. (1999)

Stat3 as an Oncogene.

Cell 98: 295-303

Brugge, J.S., McCormick, F. (1999)

Cell regulation Intracellular networking.

Curr. Opin. Cell Biol. 11: 173-176

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P. Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999)

Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor.

Cell 96: 857-868

Canman, C.E., Kastan, M.B. (1996)

Three paths to stress relief.

Nature 384: 213-214

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A. Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S., Jove, R. (1999)

Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells.

Immunity 10: 106-115

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.** (1994)
Green fluorescent protein as a marker for gene expression.
Science 263: 802-805
- Chen, R.-H., Chang, M.-C., Su, Y.-H., Tsai, Y.-T., Kuo, M.-L.** (1999)
Interleukin-6 Inhibits Transforming Growth Factor- β -induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathways.
J. Biol. Chem. 274: 23013-23019
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K.** (1998)
Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3
Science 278: 1803-1805
- Clevers, H.C., Grosschedl, R.** (1996)
Transcriptional control of lymphoid development: lessons from gene targeting.
Immunol. Today 17: 336-343
- Corey, S.J., Anderson, S.M.** (1999)
Src-Related Protein Tyrosine Kinases in Hematopoiesis.
Blood 93: 1-14
- Cross, M.A., Enver T.** (1997)
The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells.
Curr. Opin. Gen. Dev. 7:609-613
- Dhanasekaran, N.** (1998)
Cell Signaling: An overview
Oncogene 17:1329-1331
- Dhanasekaran, N., Reddy, E. P.** (1998)
Signaling by dual specific kinases
Oncogene 17:1447-1456
- Downward, J.** (1998)
Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt.
Curr. Opin. Cell Biol. 10: 262-267
- Downward, J.** (1998)
New exchange, new target.
Nature 396: 416-417
- Dumon, S., Constntino, S., Santos, R. DEbierre-Grockiego, F. Gouilleux-Gruart, V., Cocault, L., Boucheron, C., Mollat, P., Gisselbrecht, S., Gouilleux, F.** (1999)
IL-3 dependen regulation for Bcl-x_L gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line.
Oncogene 18: 4191-4199

Dyson, N., Balmain, A. (1999)
Oncogenes and cell proliferation.
Curr. Opin. Gen. Dev. 9: 11-14

Elledge, S.J. (1996)
Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis.
Science 274: 1664-1671

Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., Yoshimura, A. (1997)
A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases.
Nature 387: 921-924

Fields, S., Song, O. (1989)
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature 340: 245-246

Frank, D.A., Robertson, M.J., Bonni, A., Ritz, J., Greenberg, M. (1995)
Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 7779-7783

Fuchs, B., Wagner, T., Rössel, N., Antoine, M., Beug, H., Niessing, J. (1996)
Structure and erythroid cell-restricted expression of a chicken cDNA encoding a novel zinc finger protein of the Cys + His class.
Gene 10630: 1-8

Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., Hirano, T. (1998)
STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G₁ to S cell-cycle transition.
EMBO 17: 6670-6677

Gaffen, S.L., Lai, S.Y., Xu, W., Gouilleux, F., Groner, B., Goldsmith, M.A., Greene, W.C. (1995)
Signaling through the interleukin 2 receptor γ chain activates an STAT-5-like DNA-binding activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7192-7196

Garcia, R., Jove, R. (1998)
Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling.
J. Biomed. Sci. 5: 79-83

Garrington, T.P., Johnson, G.L. (1999)
Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 211-218

- Gerwien, J., Nielsen, M., Labuda, T., Nissen, M.H., Svejgaard, A., Geisler, C., Röpke, C., Odum, N. (1999)**
Cutting Edge: TCR Stimulation by Antibody and Bacterial Superantigen Induces Stat3 Activation in Human T Cells.
J. Immunol. 163: 1742-1745
- Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Bertoglio, J. (1998)**
Recent Advances in the Understanding of Interleukin-2 Signal Transduction.
J. Clin. Immunol. 18: 307-320
- Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes H.L., Tschlis, P.N. (1993)**
Progression of Interleukin-2 (IL-2)-Dependent Rat T Cell Lymphoma Lines to IL-2-Independent Growth Following Activation of a Gene (*Gfi-1*) Encoding a Novel Zinc Finger Protein.
Mol. Cell. Biol. 13: 1759-1768
- Gilks., C.B., Porter, S. D., Barker, C., Gout, P.W. (1995)**
Prolactin (PRL)-dependent expression of a zinc finger protein-encoding gene, *Gfi-1*, in Nb2 lymphoma cells: constitutive expression in autonomous sublines
Endocrinology 136: 1805-1808:
- Gilmour, K., Pine, R., Reich. N.C. (1995)**
Interleukin 2 activates STAT5 transcription factor (mammary gland factor) and specific gene expression in T lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10772-10776
- Goh, K.C., Haque, S.J., Williams, B.R.G. (1999)**
p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons.
EMBO 18: 5601-5608
- Gonda, T.J., D'Andrea, R.J. (1997)**
Activating Mutation in Cytokine Receptors: Implications for Receptor Function and Role in Disease.
Blood 89: 355-369
- Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L.S., Yeh, E. T.H. (1997)**
Preferential Interaction of Sentrin with a Ubiquitin-conjugating Enzyme, Ubc9
J. Biol. Chem. 272: 28198-28201
- Grimes, H.L., Chan, T.O., Zweidler-McKay, P.A., Tong, B., Tschlis, P.N. (1996)**
The *Gfi-1* Proto-Oncoprotein Contains a Novel Transcriptional Repressor Domain, SNAG, and Inhibits G₁ Arrest Induced by Interleukin-2 Withdrawal.
Mol. Cell. Biol 16: 6263-6272
- Grimes, H.L., Gilks, C.B., Chan, T.O., Porter, S., Tschlis, P.N. (1996)**
The *Gfi-1* protooncoprotein represses *Bax* expression and inhibits T-cell death.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14569-14573

- Guarente, L.** (1993)
Strategies for the identification of interacting proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1639-1641
- Hayes, T.E., Kitchen, A.M., Cochran, B.H.** (1987)
Inducible binding of a factor to the c-fos regulatory region.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1272-1276
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., Graeve, L.** (1998)
Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.
Biochem. J. 334: 297-314
- Hentze, M.W.** (1995)
Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control.
Curr. Opin. Cell Biol. 7: 393-398
- Hill, C.C., Treisman, R.** (1995)
Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors.
EMBO J. 14: 5037-5047
- Hinchcliffe, K., Irvine, R.** (1997)
Inositol lipid pathways turn turtle.
Nature 390: 123-124
- Hinds, P.W., Weinberg, R.A.** (1994)
Tumor suppressor genes.
Curr. Opin. Gen. Dev. 4: 135-141
- Hoey, T., Schindler, U.** (1998)
STAT structure and function in signaling.
Curr. Opin. Gen. Dev. 8: 582-587
- Horvath, C.M., Darnell, J.E.** (1997)
The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus.
Curr. Opin. Cell Biol. 9: 223-239
- Hunter, T.** (1997)
Oncoprotein Networks.
Cell 88: 333-346
- Ihle, J.N.** (1995)
Cytokine receptor signalling.
Nature 377: 591-594
- Ihle, J.N.** (1996)
STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription.
Cell 84: 331-334

- Jain, N., Zhang, T., Fong, S.L., Lim, C.P., Cao, X. (1998)**
Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK).
Oncogene 17: 3157-3167
- Janeway, C.A., Bottomly, K. (1994)**
Signals and Signs for Lymphocyte Responses.
Cell 76: 275-285
- Janknecht, R., Hunter, T. (1999)**
Nuclear Fusion of Signaling Pathways.
Science 284: 443-444
- John, S., -Robbins, C.M., Leonard, W.J. (1996)**
An IL-2 response element in the human IL-2 receptor α chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein.
EMBO 15: 5627-5635
- Karin, M. (1994)**
Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors.
Curr. Opin. Cell Biol. 6: 415-424
- Kinzler, K.W., Vogelstein B. (1998)**
Landscaping the cancer terrain.
Science 280: 1036-1037
- Kordula, T., Ryde., R.E., Brigham, E.F., Horn, F., Heinrich, P.C., Travis, J. (1998)**
Oncostatin M and the Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor Complex Regulate α_1 -Antichymotrypsin Expression in Human Cortical Astrocytes.
J. Biol. Chem. 273: 4112-4118
- Kovarik, P., Stoiber, D., Eysers, P.A., Menghini, R., Neininger, A., Gaestel, M., Cohen, P., Decker, T. (1999)**
Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN- γ uses a different signaling pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 13956-13961
- Kretzschmar, M., Massague, J. (1998)**
SMADs: mediators and regulators of TGF β signalling.
Curr. Opin. Cell Biol. 8: 103-111
- Kuriyan, J., Darnell, J.E. (1999)**
An SH2 domain in disguise.
Nature 398: 22-23
- Lamond, A.I., Earnshaw, W.C. (1998)**
Structure and Function in the Nucleus.
Science 280: 547-553

- Lanfrancone, L., Pelicci, G., Pelicci, P.G.** (1994)
Cancer genetics.
Curr. Opin. Gen. Dev. 4: 109-119
- Leaman, D.W., Pisharody, S., Flickinger, T.W., Commene, M.A., Schlessinger, J., Kerr, I.m., Levy, D.E., Stark, G.R.** (1996)
Roles of JAKs in Activation of STATs and Stimulation of c-fos Gene Expression by Epidermal Growth Factor.
Mol. Cell. Biol. 16: 369-375
- Leeuwen, J.E.M. van, Samelson, L. E.** (1999)
T cell antigen-receptor signal transduction.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 242-248
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.** (1998)
Genetic instabilities in human cancers.
Nature 396: 643-648
- Lewin, B.** (1991)
Oncogenic Conversion by Regulatory Changes in Transcription Factors.
Cell 64: 303-312
- Li, H., Yuan, J.** (1999)
Deciphering the Pathways of life and death.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 261-266
- Lim, C.P., Cao, X.** (1999)
Serine Phosphorylation and Negative Regulation of Stat3 by JNK.
J. Biol. Chem. 274: 31055-31061
- Linsley, P.S., Reth, M.** (1999)
Lymphocyte activation and effector functions Multistory progress: increasing organization on all levels.
Curr. Opin. Immunol. 11: 239-241
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K.** (1998)
Inhibition of Stat 1-mediated gene activation by PIAS 1.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 10626-10631
- Lovec, H., Sewing, A., Lucibello, F., Müller, R., Möry T.,** (1994)
Oncogenic activity of Cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras.
Oncogene 9:323-326
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J.** (1999)
Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein coupled receptors.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 177-183
- Mackay, J.P., Crossley, M.** (1998)
Zinc fingers are sticking together.
TIBS 23: 1-4

- Mangelsdorf, D.J.,** Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M. (1995)
The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade.
Cell 83: 835-839
- Marx, J.** (1994)
How Cells Cycle Toward Cancer.
Science 263: 319-321
- Mercurio, F.,** Manning, A.M. (1999)
Multiple signals converging on NF- B.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 226-232
- Misteli, T.,** Spector, D.L. (1998)
The cellular organization of gene expression.
Curr. Opin. Cell Biol. 10: 323-331
- Mochly-Rosen, D.** (1995)
Localization of Protein Kinases by Anchoring Proteins: A Theme in Signal Transduction.
Science 268: 247-268
- Moilanen, A.-M.,** Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W. Topparis, J., Jänne, O.A., Palvimo, J.J. (1999)
A testis-specific Androgen Receptor Coregulator that Belongs to a Novel Family of Nuclear Proteins.
J. Biol. Chem. 274: 3700-3704
- Montminy, M.** (1997)
Transcriptional regulation by cyclic AMP.
Ann. Rev. Biochem. 66: 807-822
- Moriggl, R.,** Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. (1999)
Stat5 Is Required for IL-2-Induced Cell cycle Progression of Peripheral T Cells.
Immunity 10: 249-259
- Möröy, T.,** Zörnig, M. (1996)
Regulators of Life and Death: The Bcl-2 Gene Family.
Cell. Physiol. Biochem. 6: 312-336
- Möröy, T.,** Zörnig, M. Schmidt, S., (1999)
Retroviral tagging with MoMuLV and the discovery of new oncogenes in:
VIRUSES, CELL TRANSFORMATION AND CANCER, (R.E. Grand, ed, JAI PRESS),
in press
- Müller, R.,** Mumberg, D., Lucibello, F. (1993)
Signals and genes in the control of cell-cycle progression.
Biochem. Biophys. Acta 1155: 151-179

- Nakajima, T.**, Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.-G., Hurwitz, J., Parvin, J.D., Montminy, M. (1997)
RNA Helicase A Mediates Association of CBP with RNA Polymerase II.
Cell 90: 1107-1112
- Ndubuisi, M.I.**, Guo, G.G., Fried, V.A., Etlinger, J.D., Schgal, P.B. (1999)
Cellular Physiology of STAT3: Where's the Cytoplasmic Monomer.
J. Biol. Chem. 274: 25499-25509
- Nemazee, D.**, Fowlkes, B.J. (1999)
Lymphocyte Development.
Curr. Opin. Immunol. 11: 127-128
- Neuberger, M.S.** (1997)
Antigen Receptor Signaling Gives Lymphocytes a Long Life.
Cell 90: 971-973
- Nevins, J.R.** (1994)
Cell cycle targets of the DNA tumor viruses.
Curr. Opin. Gen. Dev. 4: 130-134
- Newton, A.** (1997)
Regulation of protein kinase C.
Curr. Opin. Cell Biol. 9: 161-167
- Nielsen, M.**, Svejgaard, A., Skov, S., Odum, N. (1994)
Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of stat3 in human T lymphocytes.
Eur. J. Immunol. :3082-3086
- Nosaka, T.**, Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A.L.-F., Kitamura, T. (1999)
STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells.
EMBO 18: 4754-4765
- O'Garra, A.** (1998)
Cytokines Induce the Development of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets.
Immunity 8: 275-283
- Orkin, S.H.** (1996)
Development of the hematopoietic system.
Curr. Opin. Gen. Dev. 6:597-602
- Paulovich, A.G.**, Toczyski, D.P., Hartwell, L.H. (1997)
When Checkpoints Fail.
Cell 88: 315-321
- Pennisi, E.** (1998)
How a Growth Control Path Takes a Wrong Turn to Cancer.
Science 281: 1438-1441

- Peto, R.,** Roe, F.J.C., Lee, P.N., Levy, L., Clacik, J. (1975)
Cancer and aging in mice and men
Br. J. Cancer 32: 311-426
- Pritchard, C.,** McMahon, M. (1997)
Raf revealed in life-or-death decisions.
Nature Genetics 16: 214-215
- Qian, D.,** Weiss, A. (1997)
T cell antigen receptor signal transduction.
Curr. Opin. Cell Biol. 9: 205-212
- Rajewsky, K.,** Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J., Schwenk, F. (1996)
Conditional gene targeting.
Clin. Invest. Aug. :600-603
- Rajotte, D.,** Sadowski, H.B., Haman, A., Gopalbhai, K., Meloche, S., Liu, L., Krystal, G., Hoang, T. (1996)
Contribution of Both STAT and SRF/TCF to c-fos Promoter Activation by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.
Blood 88: 2906-2916
- Resh, M.D.** (1993)
Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes.
Biochim. Biophys. Acta 1155: 307-322
- Roberts, T.,** Cowell, J.K. (1997)
Cloning of the human Gfi-1 gene and its mapping to chromosome region 1p22.
Oncogene 14: 1003-1005
- Rödel, B.** (1995)
Untersuchung zur Interaktion der POU-Transkriptionsfaktoren Brn-3A(l) und Brn-3B(k) *in-vitro* und *in-vivo*
Diplomarbeit im Fach Humanbiologie an der Philips-Universität Marburg
- Roedel, B.,** Wagner, T., Zörnig, M., Niessing J., Möröy T. (1998)
The human homologue (GFI1B) of the chicken Gfi Gene maps to chromosome 9q34 - a locus frequently altered in hematopoietic diseases
Genomics 15: 580-582
- Rommel, C.,** Hafen, E. (1998)
Ras - a versatile cellular switch.
Curr. Opin. Cell Biol. 8: 412-418
- Rudd, C.E.,** Janssen, O., Prasad, K.V.S., Raab, M., da Silva, A., Telfer, J.C., Yamamoto, M.(1993)
src-related protein tyrosine kinases and their surface receptors.
Biochim. Biophys. Acta 1155: 239-266

- Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E., Gilman, M.Z. (1993)**
A Common Nuclear Signal Transduction Pathway Activated by Growth Factor and Cytokine Receptors.
Science 261: 1739-1744
- Salmon, E.D., Way, M. (1999)**
Cytoskeleton.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 15-17
- Saparov, A., Wagner, F.H., Zheng, R., Oliver, J.R., Maeda, H., Hockett, D., Weaver, C.T. (1999).**
Interleukin-2 Expression by a Subpopulation of Primary T Cells Is Linked to Enhanced Memory/Effector Function.
Immunity 11: 271-280
- Scharenberg, A.M., Kinet, J-P. (1998)**
PtdIns-3,4,5,-P3: A Regulatory Nexus between Tyrosine Kinases and Sustained Calcium Signals.
Cell 94: 5-8
- Schenk, P.W., Snaar-Jagalska, B.E. (1999)**
Signal perception and transduction: the role of protein kinases.
Biochim. Biophys. Acta 1449: 1-24
- Schindler, C., Darnell, J.E. (1995)**
Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway.
Annu. Rev. Biochem. 64: 621-651
- Schmidt, T., Karsunky, H., Rödel, B., Zevnik, B., Elsässer, H.-P., Mörröy, T. (1998)**
Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with - selection.
EMBO 17: 5349-5359
- Schmidt, T., Karsunky, H., Zevnik, B., Elsässer, H. P., Mörröy, T. (1998)**
Zinc finger protein Gfi-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with Pim and Myc genes in T-cell lymphomagenesis
Oncogene 17: 2661-2668
- Schmidt, T., Körner, K., Karsunky, H., Korsmeyer, S., Müller R., Mörröy, T. (1999)**
The murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53
CELL DEATH & DIFFERENTIATION, in press
- Schmidt, T., Zörnig, M., Beneke, R., Mörröy, T. (1996)**
MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumours from infected *myc/pim* bitransgenic mice correlate with activation of the *gfi-1* gene.
Nucl. Acids Res. 24: 2528-2534

Schmidt, T. (1998)

Untersuchung zur Funktion des Zinkfingerproteins Gfi-1 in der Entwicklung und Transformation von T-Zellen
Inaugural-Dissertation im Fachbereich Medizin an der Philips-Universität Marburg

Schoenwaelder, S.M., Burridge, K. (1999)

Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 274-286

Schwartz, M.A., Baron, V. (1999)

Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections.
Curr. Opin. Cell Biol. 11: 197-202

Serdobova, I., Pla, M., Reichenbach, P., Sperisen, P., Ghysdael, J., Wilson, A., Freeman, J., Nabholz, M. (1997)

Elf-1 Contributes to the Function of the Complex Interleukin (IL)-2-responsive Enhancer in the Mouse IL-2 Receptor Gene.
J. Exp. Med. 185: 1211-1221

Sherr, C.J. (1996)

Cancer Cell Cycles
Science 274: 1672-1677

Shuai, K. (1999)

The STAT family of proteins in cytokine signaling
Prog. in Bioph. & Mol. Biol. 71: 405-422

Shyy, J.Y.-J., Chien, S. (1997)

Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion.
Curr. Opin. Cell Biol. 9: 707-713

Socolovsky, M., Fallon, A.E.J., Wang, S., Brugnara, C., Lodish, H.F. (1999)

Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-x_L Induction.
Cell 98: 181-191

Solis-Herruzo, J.A., Rippe, r.A., Schrum, L.W., Torre, P. de la, Garcia, I., Jeffrey, J.J., Munoz-Yague, T., Brenner, D.A. (1999)

Interleukin-6 Increases Rat Metalloproteinase-13 Gene Expression through Stimulation of Activator Protein 1 Transcription Factor in Cultured Fibroblasts.
J. Biol. Chem. 274: 30919-30926

Sperisen, P., Wang, S.M., Soldaini, E. P. M., Rusterholz, C., Bucher, P., Cortes, P., Reichenbach, P., Nabholz, M. (1995)

Mouse Interleukin-2 Receptor Gene Expression.
J. Biol. Chem. 270: 10743-10753

Spitzer, N.C., Sejnowski, T.J. (1997)

Biological Information Processing: Bits of Progress.
Science 277: 1060-1061

Streuli, M. (1996)

Protein tyrosine Phosphatases in signaling.

Curr. Opin. Cell Biol. 8: 182-188

Su, B., Karin, M. (1996)

Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression.

Curr. Opin. Immunol. 8: 402-411

Sudol, M. (1998)

From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'

Oncogene 17: 1469-1474

Suzuki, N., Matsunami, N., Knamori, H., Ishida, N., Shimizu, A., Yaoita, Y., Nikaido, T., Honjo, T. (1987)

The Human IL-2 Receptor Gene Contains a Positive Regulatory Element That Functions in Cultured Cells and Cell-free Extracts.

J. Biol. Chem. 262: 5079-5086

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N. Takeda, J., Kishimoto, T. Akira, S. (1998)

Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice.

J. Immunol. 161: 4652-4660

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. (1997)

Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality.

Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 3801-3804

Taniguchi, T. (1995)

Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Tyrosine Kinases.

Science 268: 251-255

Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E. van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, J.N. (1998)

Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses.

Cell 93: 841-850

Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., Zhang, D.E. (1997)

Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia.

Blood 90: 489-519

Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P., Crabtree GR (1996)

Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression.

Nature :837-840

- Tjin Tham Sijin**, R.M., Lord, K.A., Abdollahi, A., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (1999)
Interleukin-6 and Leukemia Inhibitory Factor Induction of JunB Is Regulated by Distinct Cell Type-specific Cis-acting Elements.
J. Biol. Chem. 274, 28697-28707
- Tong**, B., Grimes, H.L., Yang, T.-Y., Bear, S.E., Qin, Z., Du, K., El-Deiry, W.S., Tsichlis, P.N. (1998)
The Gfi-1B Proto-Oncoprotein Represses p21^{waf1} and Inhibits Myeloid Cell Differentiation.
Mol. Cell. Biol 18: 2462-2473
- Torchia**, J., Glass, C., Rosenfeld, M.G. (1998)
Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses.
Curr. Opin. Cell Biol. 10: 373-383
- Tsunoda**, S., Sierralta, J., Zuker, C.S. (1998)
Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes.
Curr. Opin. Cell Biol. 8: 419-422
- Turkson**, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y. Djeu, J.Y., Sekharam, M., Frank, D.A., Holzman, L.B., Wu, J., Sebt, S., Jove, R. (1999)
Requirement for Ras/Rac1-Mediated p38 and c-Jun N-Terminal Kinase signaling in Stat3 Transcriptional Activity Induced by the Src Oncoprotein.
Mol. Cell. Biol. 19: 7519-7528
- Tybulewicz**, V.L.J. (1998)
Analysis of antigen receptor signalling using mouse gene targeting.
Curr. Opin. Cell Biol. 10: 195-204
- Valdez**, B.C., Henning, D., Perlaky, L., Busch, R.K., Busch, H. (1997)
Cloning and Characterization of Gu/RH-II Binding Protein.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 234: 335-340
- van Lohuizen**, M., Berns, A. (1990)
Tumorigenesis by slow-transforming retroviruses: an update
Biochem. Biophys. Acta 1032:213-235
- Vogelstein**, B., Kinzler, K.W. (1993)
The multistep nature of cancer.
TIGS 9: 138-141
- Wange**, R.L., Samelson, L.E. (1996)
Complex Complexes: Signaling at the TCR.
Immunity 5: 197-205
- Waskiewicz**, A.J., Cooper, J.A. (1995)
Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast.
Curr. Opin. Cell Biol. 7: 798-805

Weinert, T. (1997)

A DNA Damage Checkpoint Meets the Cell Cycle Engine.

Science 277: 1450-1451

Weinert, T. (1998)

DNA Damage and Checkpoint Pathways: Molecular Anatomy and Interactions with Repair

Cell 94: 555-558

Wen., Z., Zhong., Z., Darnell, J.E. Jr. (1995)

Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.

Cell 28 :241-250

Weng, G., Bhalla, U.S., Iyengar, R. (1999)

Complexity in Biological Signaling Systems.

Science 284: 92-96

Wible, B., Yang, Q., Kuryshev, Y.A., Accili, E.A., Brown, A.M. (1998)

Cloning and Expression of a Novel K⁺ Channel Regulatory Protein, KChAP.

J. Biol. Chem. 273: 11745-11751

Willerford, D.M., Swat, W., Alt, F.W. (1996)

Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation

Curr. Opin. Gen. Dev. 6: 603-609

Wu, L., Wu, H., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J.R., Lyons, G.E., Maxson, R. (1997)

Mizl, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA.

Mech. Devel. 65: 3-17

Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell G.S., Lerner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., Jove, R. (1995)

Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein.

Science 269: 81-3

Zacherman, A. Zipori, D., Ben-levy, R. (1999)

Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3.

Oncogene 18: 3886-3893

Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C., Chen-Kiang, S. (1995)

Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes.

Science : 1990-1994

Zörnig, M. (1995)

Mechanismen der Onkogenkooperation und Identifizierung neuer kooperierender Ereignisse im transgenen Maussystem

Inaugural-Dissertation im Fachbereich Chemie an der Philips-Universität Marburg

Zörnig, M., Schmidt, T., Karsunky, H., Grzeschiczek, A., Möröy, T. (1996)
Zing finger protein *GFI-1* cooperates with *MYC* and *PIM-1* in T-Cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2.
Oncogene 12: 1789-1801

Zweidler-Mckay, P.A., Grimes, H.L., Flubacher, M.M., Tschlis, P.N. (1996)
Gfi-1 Encodes a Nuclear Zinc Finger Protein That Binds DNA and Functions as a Transcriptional Repressor.
Mol. Cell. Biol 16: 4024.4034

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

Bernd Rödel

<u>Datum</u>	<u>Ereignis</u>
07.01.1969	Geburt in Köln
1975-1979	Besuch der Grundschule in Pulheim-Dansweiler
1979-1988	Besuch des Abtei-Gymnasiums in Pulheim-Brauweiler
1988	Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
1988-1990	Zivildienst im Kranken- und Behindertentransportwesen
1990-1990	Chemiestudium in Köln
1990-1994	Humanbiologiestudium an der Philipps-Universität Marburg
1994-1995	Diplomarbeit bei Dr. Tarik Möröy im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg
1995	Diplom in Humanbiologie
1995-1999	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Tarik Möröy, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum, Gesamthochschule Essen.

Essen, den 9.12.1999

(Bernd Rödel)

7.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Beato, Elsässer, Frenkin, Fruhsdorfer, Fuhs, Golenhofen, Habermehl, Hartmann, Ihm, Kaffarnik, Kern, Kirchner, Koolman, Lang, Lauer, Löffler, Lorbert, Lührmann, Möröy, Müller, Niessing, Petzold, Reufel, Riesau, Röhm, Schachtschabel, Schindler, Schulz, Seifart, Seitz, Siegel, Unsicker, Vogt, Wesemann, Westphal.

7.3 Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und die Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Seine Gesprächsbereitschaft hat mir auch über schwierige Situationen immer hinweg geholfen.

„This is a man’s world, but it would be nothing without a woman“ - Vielen Dank Esther!

Meiner Mutter, meinem Bruder und der Familie meiner Frau möchte ich für die Unterstützung während der letzten Jahre besonders danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinrich (RWTH Aachen) und bei Herrn Dr. Fred Schapers möchte ich mich für die Hilfe bei der Untersuchung der Stat3 Signaltransduktion bedanken. Den Wissenschaftlern Ke Shuai, James Darnell jr. und Tetsuo Hirano möchte ich danken, daß sie mir die erwähnten Plasmide zur Verfügung gestellt haben.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Kollegen bedanke ich mich für die Hilfe und die Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Insbesondere möchte ich Christoph Geisen für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit und Dr. habil. Hans Peter Elsässer für die Hilfe bei den Aufnahmen am Mikroskop, Holger Karsunky für die Hilfe bei den T-Zell-stimulationsexperimenten, sowie allen anderen Mitarbeitern auf dem Gfi-1 Projekt für die gegenseitige Unterstützung und den Austausch von wissenschaftlichen Ergebnissen danken.

Bei den Menschen außerhalb des Labors möchte ich insbesondere Klaus Lennartz, den Leidensgenossen in EDV-Problemen, „Onkel“ Hans Zieren, den REPARATOR, Brigitte Lelekakis, die unerschöpfliche Schreibwarenquelle, die wissenschaftliche Administration des IFZ, sowie Christoph, Thorsten, Kathi, Eva, Thomas und Julius hervorheben, die mir in den letzten vier Jahren auf die eine oder andere Art geholfen haben.

7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 21.05.2000

(Bernd Rödel)

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 21.05.2000

(Bernd Rödel)